FACULTE DE MEDECINE DE DIJON

Année 1974 - N* 6

ETUDE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES STEROIDES URINAIRES DANS HUIT CAS D'HYPERPLASIE SURRENALE CONGENITALE

THESE

présentée

à la Faculté de Médecine de DIJON

et soutenue publiquement le 1er mars 1974

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

MAIRE jacques

né le 12 octobre 1943 à DIJON

FACULTE DE MEDECINE DE DIJON

Année 1974 - N*

ETUDE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES STEROIDES URINAIRES DANS HUIT CAS D'HYPERPLASIE SURRENALE CONGENITALE

THESE

présentée

à la Faculté de Médecine de DIJON

et soutenue publiquement le 1er mars 1974

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

MAIRE jacques

né le 12 octobre 1943 à DIJON

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

- - Personnel de la Faculté - -

M. J.B. BOUHEY	: Doyen
M. A. MARIN	: Assesseur
M. R. PUTELAT	: Assesseur
M. J.P. DIDIER	: Assesseur
M. J. GUERRIN	: Assesseur

M. J. GUYOT : Professeur honoraire
M. F. BARON : Professeur honoraire

Professeurs titulaires

Anatomie et organogénèse : P. BARRY

Anatomie pathologique et carcinologie : F. CABANNE

Biochimie : P. PADIEU

Clinique chirurgicale : H. VIARD

Clinique médicale : P. CORTET

Clinique obstétricale : J. JAHIER

Clinique médicale infantile : M. ALISON

Clinique neuropsychiatrique : J. BALLIVET

Histologie, Embryologie cytogénétique : G. RUCART

Médecine légale et toxicologie : A. MARIN

Pathologie chirurgicale : C. FERRY

Pathologie médicale : R. PUTELAT

Physiologie : J. KLEPPING

Biophysique : P. GAILLIARD

Sémiologie médicale : J.B. BOUHEY

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549827_0009

Professeurs sans chaire

Anatomie pathologique : R. MICHIELS

Biochimie : J. DEDREUX

Hépatologie, Gastro-entérologie : Cl. KLEPPING

Médecine préventive et Santé publique, Hygiène : M. CARON

Maladies infectieuses : F. DESTAING

Parasitologie : Mme Y. ROUGET

Professeur chargé de cours à titre permanent

Bactériologie, Virologie : P. PICHAT

Maîtres de Conférences agrégés

Anatomie et Organogénèse : J.M. AUTISSIER

Anesthésiologie : B. CAILLARD

Carcinologie : J. GUERRIN

Chirurgie générale : P. AUPECLE

S. BRIET

N..

Gynécologie et Obstétrique : J. SALASC

N...

Hématologie et Maladies du sang : A. DUZER

Médecine et Chirurgie expérimentale et comparées, Immunologie : F. MARTIN

Médecine interne : M. GAUDET

P. LOUIS

Néphrologie : N..

Neurochirurgie : A. THIERRY

Orthopédie, Traumatologie, Chirurgie plastique et reconstruction : N...

Pédiatrie et Génétique médicale : J.L. NIVELON

Pharmacologie : A. ESCOUSSE

Physiologie : J.P. DIDIER

Pneumologie, Phtisiologie : L. JEANNIN

Radiologie, radiodiagnostic : J.P. MABILLE

M. WEILLER

Radiologie, radiothérapie : J.Cl. HORIOT

Professeur associé

Biochimie : W. MOMMAERTZ

Agrégés libres

Dermatologie, Vénéréologie : J.L. CHAPUIS

Ophtalmologie : P.G. MOREAU

Urologie : R. GAYET

- - - - - - - -

La Faculté de Médecine de Dijon déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

- - -

JURY DE LA THESE

- - - - - - - - - -

Président : Monsieur le Professeur R. PUTELAT

Membres : Monsieur le Professeur P. PADIEU

Monsieur le Professeur C. FERRY

Monsieur le Professeur Agrégé J.L. NIVELON

A mes parents

A ma femme

A tous mes frères et soeurs

A mes amis de "sous colle" Messieurs J.P. CLEOPHAX
C. DUCHAMP
J. NONNENMACHER,
internes des Hôpitaux

Et à tous ceux qui me sont chers

Avec toute mon affection

À mon Maître et Président de thèse

Monsieur le Professeur R. PUTILAT

qui a bien voulu m'avoir dispensé son enseignement,

m'a inspiré ce travail et conseillé tout au long

de son élaboration et de sa rédaction,

qu'il trouve ici le témoignage de ma respectueuse

gratitude.

A Monsieur le Professeur P. PADIEU

Qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire, et me donner toute facilité pour réaliser ce travail tout en m'aidant de ses conseils,

Qu'il reçoive ici l'expression de mes vifs remerciements.

A Monsieur le Professeur C. FERRY

En témoignage de mon estime.

A Monsieur le Professeur Agrégé J.L. NIVELON

Qui a bien voulu me confier ses observations et m'éclairer dans mes recherches.

A tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé dans
la rédaction de ce travail.

A Monsieur DESGRES, Monsieur BEGUE et leurs collaboratrices,
qui m'ont initié à la technique de la chromatographie,
puis ont redressé mes erreurs par une collaboration
constante.

Nous leur exprimons ici toute notre reconnaissance.

A mes Maîtres d'Externat et d'Internat
et à tous ceux qui m'ont formé.

A Monsieur le Professeur H. BRICAIRE
qui a bien voulu m'accueillir dans son service,
et me dispenser son enseignement si clair et si vivant.

PLAN

INTRODUCTION

RAPPEL CLINIQUE ET PHYSIOPATHOLOGIQUE SUR L'HYPERPLASIE SURRENALE CONGENITALE :

- Historique
- Déficit en 21 hydroxylase
  - Physiopathologie
  - Etude clinique
  - Evolution
  - Biologie
  - Forme avec perte de sel
- Autres blocs enzymatiques
- Conclusions

TECHNIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

- Principe théorique de la méthode
- Régles d'utilisation ; facteurs influents
  - Support
  - Phase stationnaire : son choix, son pourcentage
  - Longueur de la colonne, diamètre
  - Colonnes capillaires
  - Phase mobile gazeuse : son choix
  - Débit optimum
  - Température d'utilisation
  - Programmation de température
  - Introduction des échantillons
  - Instruments de détection et méthodes de mesure
- Relations entre la structure des composés et leur temps de rétention sur la colonne
- Intérêt de l'application à l'analyse des stéroides urinaires

PROBLEMES PRATIQUES POSES PAR L'APPLICATION DE LA METHODE A L'ANALYSE STEROIDIENNE

- Difficultés liées à un travail quantitatif
- Intérêt - de la formation de dérivés
  - de l'usage d'un étalon interne
- Amélioration de la technologie apportées par les différents auteurs

Difficultés liées et solutions apportées aux problèmes
- d'une extraction quantitative des stéroides à partir des urines
- d'une hydrolyse compléte des conjugués stéroidiens
- de la formation de dérivés stables dans les conditions de séparation

Description du procédé utilisé

REVUE DES HUIT OBSERVATIONS D'HYPERPLASIE SURRENALE CONGENITALE

Clinique
Résultats des dosages stéroidiens et commentaires.
Tableau

REVUE DES DONNEES DE LA LITTERATURE

Etude chronologique
Points d'accord des divers auteurs
Comparaison avec nos propres résultats
Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

- -

-

Difficultés liées et solutions apportées aux problèmes
- d'une extraction quantitative des stéroides à partir des urines
- d'une hydrolyse compléte des conjugués stéroidiens
- de la formation de dérivés stables dans les conditions de séparation

Description du procédé utilisé

REVUE DES HUIT OBSERVATIONS D'HYPERPLASIE SURRENALE CONGENITALE
Clinique
Résultats des dosages stéroidiens et commentaires.
Tableau

REVUE DES DONNEES DE LA LITTERATURE
Etude chronologique
Points d'accord des divers auteurs
Comparaison avec nos propres résultats
Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

- -

-

I N T R O D U C T I O N

L'hyperplasie surrénale congénitale par déficit enzymatique sur la chaine de synthèse des corticostéroïdes est une maladie assez fréquente : PRADER en Suisse l'évalue à 1 naissance sur 5 000, et ROSENBLOOM l'évalue à 1/10 000 (161). Nous avons pu en observer 8 cas au C.H.R. de Dijon pendant les dernières années. 4 observations nous ont été confiées par le Professeur agrégé NIVELON et les 4 autres ont été recueillies dans le service du Professeur PUTELAT. Leur physiopathologie est maintenant bien connue : l'organisme réagit au déficit en glycocorticoides par une stimulation de la surrénale qui dès lors produit en quantité accrue ce qu'elle peut produire, à savoir les androgènes et des métabolites intermédaires de la chaine de biosynthèse des corticoides.

C'est dire l'intérêt pour l'exploration de tels malades de l'étude détaillée des métabolites stéroidiens urinaires, rendue possible par une technique mise au point dans le Laboratoire de Chimie Biologique du Professeur PADIEU par J. BEGUE et J. DESGRES (47) : il s'agit d'un procédé relativement simple utilisant la chromatographie des stéroides urinaires en phase gazeuse, et séparant la plupart des 20 Oxo. 21 Deoxy C 21 Stéroides et les 17 Oxostéroides.

Nous étudierons, après un court rappel clinique et physiopathologique sur l'hyperplasie surrénale congénitale, dans une première partie la technique elle-même : ses principes, son évolution chronologique, ses applications aux stéroides, enfin le procédé utilisé au laboratoire du C.H.U.
Dans une deuxième partie, après une description clinique des cas étudiés, nous donnerons les résultats obtenus, puis ceux retrouvés dans la littérature pour conclure par une comparaison.

RAPPEL CLINIQUE ET PHYSIOPATHOLOGIQUE

SUR L'HYPERPLASIE SURRENALE CONGENITALE

- - - - - - - - - - - - - - - - - -

Rappel clinique et physiopathologique sur l'hyperplasie surrénale congénitale -

Historique :

L'histoire de l'hyperplasie surrénale congénitale commence en 1865, avec la description princeps de DI.CRECCHIO qui rapporte l'observation d'un "homme", hypospade, sans testicules et porteur d'organes génitaux internes de type féminin ainsi que d'une hyperplasie des glandes surrénales. Il avait été déclaré comme fille à sa naissance. MARCHAND reconnait le premier en 1891 l'association du pseudohermaphrodisme féminin et de l'hyperplasie surrénale congénitale. En 1896, est réalisée la première tentative de traitement par un extrait surrénal de mouton.

En 1925, DEBRE et FIBIGER individualisent le syndrome qui porte leur nom et qui intéresse des nouveaux-nés mâles, sans anomalies des organes génitaux mais porteurs d'une hyperplasie surrénale. Celle-ci est responsable d'une perte de sel, et de déshydratation dans un tableau de vomissements et de diarrhées pouvant entrainer la mort. Elle ne céde qu'au traitement substitutif.

En 1935, ZIMMERMAN met au point une réaction de dosage quantitatif des 17 Oxostéroides : grace à cette réaction de nombreux auteurs constatent l'élévation des 17 Oxostéroides lors de l'Hyperplasie surrénale congénitale.

C'est en 1937 que REICHSTEIN et STEIGER synthétisent l'acétate de déoxycortisone, premier traitement efficace de la maladie. La même année, BUTLER et MARIAN isolaient de l'urine de femmes atteintes de la maladie le pregnanetriol, métabolite principal apparaissant en quantité accrue en conséquence du bloc enzymatique, mais l'intérêt de ce métabolite ne sera reconnu que plusieurs années plus tard.

En 1953, WILKINS et son équipe suppriment la sécrétion d'androgènes et par voie de conséquence la virilisation grace à un traitement par la cortisone. En effet JAILER et BARTTER ont montré grace à des administrations d'Adréno-

corticotrophine que chez ces malades, il n'y a pas d'élévation du cortisol comme chez les sujets normaux en raison du bloc enzymatique, mais que l'on constate par contre une élévation marquée du prégnanetriol et des 17 Oxostéroides qui résulte du métabolisme des précurseurs s'accumulant en amont du bloc enzymatique.

Enfin en 1954, PRADER mettra au point une classification en fonction du degré d'importance de la masculinisation des organes génitaux externes dans le pseudohermaphrodisme féminin.

Depuis plusieurs types de blocs ont pu être individualisés.

I) Forme habituelle par bloc de la 21 Hydroxylation - Physiopathologie :

Quoi qu'il en soit, la physiopathologie de la maladie est toujours la même : un déficit enzymatique empêche la secrétion normale des glycocorticoides et principalement du cortisol. L'hypothalamus sensible au déficit périphérique en cortisol secrétera le releasing factor de la corticotrophine ou C.R.F. ; sous l'action de ce polypeptide l'hypophyse libérera des quantités accrues d'A.C.T.H. ou adrénocorticotrophine. La surrénale va réagir à cette stimulation plus importante en s'hypertrophiant et en secrétant des quantités augmentées de métabolites, jusqu'au niveau du bloc enzymatique en amont duquel vont s'accumuler les précurseurs qui seront libérés dans le sang et normalement métabolisés, puis excrétés dans les urines. La stimulation interviendra également sur la biosynthèse des androgènes qui sera accrue (en effet les blocs enzymatiques intéressant cette voie de biosynthèse sont exceptionnels). C'est l'hypersecrétion de ces androgènes qui sera à l'origine de la masculinisation des filles, ou de la pseudopuberté précoce des garçons. Cette masculinisation pourra dans le cas des filles atteindre des degrés divers, en fonction d'une part de l'importance de la secrétion androgénique, d'autre part de la période de la vie foetale, de l'enfance ou de l'adolescence où a commencé l'imprégnation par les androgènes.

Clinique :

Ainsi le tableau clinique peut varier en fonction de l'a précocité de cette virilisation. Dans le cadre du pseudo-hermaphrodisme féminin, si l'hyperandrogénie a eu lieu pendant la vie foetale, des malformations peuvent être observées dès la naissance. D'après PRADER on distingue :

- le type I rare, avec simple hypertrophie clitoridienne, forme la plus minime de l'affection,
- le type II : outre l'anomalie précédente, il existe un étroit vestibule, en forme d'entonnoir dans lequel débouchent cote à cote les orifices vaginaux et urétéraux.
- le type III : le clitoris est très volumineux et à sa base se trouve un orifice rond simulant un méat et donnant accès à un sinus urogénital ayant en profondeur cote à cote les orifices vaginal et urétéral. Les grandes lèvres évoquent alors un scrotum partiellement fendu.
- type IV : clitoris hypertrophié ressemblant à une verge hypospade, avec une gouttière à sa face ventrale partant du gland et aboutissant à une petite ouverture méatique où s'ouvre l'urétre, urétre où s'abouche, à quelques centimètres du périnée, le vagin. Les grandes lèvres simulent alors un scrotum où, bien évidemment, on ne perçoit pas de testicules.
- Enfin le type V, rare, réalise une masculinisation complète des organes génitaux externes qui ressemblent à ceux d'un nouveau-né mâle avec toutefois des bourses vides, et un abouchement du vagin très haut dans l'urétre qui pourra être mis en évidence par une opacification rétrograde.

Si la virilisation se produit plus tardivement (de la naissance à la puberté) on aboutit à un tableau de pseudo-puberté précoce, homo ou hétérosexuelle en fonction du sexe gonadique, avec très grosse accélération de la croissance staturale, et encore plus de l'âge osseux : développement de la pilosité, mue de la voix, acné, morphologie androïde, développement musculaire important, etc...

Enfin dans des formes peu évolutives, c'est l'absence de puberté réelle qui donnera l'alerte : la croissance s'est arrêtée par soudure des cartilages et les seins ne se développent pas, les régles ne surviennent pas. Les hormones gonadotropes restent basses, probablement en raison d'un freinage par les androgènes produits en excès en raison du bloc enzymatique.

Chez le garçon le tableau clinique est, comme nous l'avons déjà signalé, celui d'une fausse puberté précoce, survenant habituellement à l'âge de 3 ou 4 ans, où se développent anormalement la pilosité, la musculature et la verge, dont la taille contraste avec celle des testicules restés infantiles. Là encore, il y a avance de l'âge statural, et surtout de la maturation osseuse, faisant courir le risque d'une soudure précoce des cartilages osseux et par la même d'un arrêt prématuré de la croissance.

Evolution :

Traitée, l'évolution de ces formes est favorable grace à une opothérapie à vie par la cortisone, la puberté vraie survenant normalement dans les 2 sexes, avec régression des signes de virilisme, la séquelle la plus ennuyeuse étant l'avance de la maturation osseuse. En effet, bien que la cortisone agisse également à ce niveau, la taille définitive sera rarement importante en raison de la soudure prématurée des cartilages de conjugaison. Sur le plan génital, l'avenir des sujets traités est normal et des grossesses ont pu être menées à terme.

Biologie :

Sur le plan biologique, le défaut enzymatique le plus répandu intéresse la 21 HYDROXYLATION, qui dans la chaîne de la synthèse du cortisol, où dans la nomenclature internationale 11 β , 17 α , 21-trihydroxy-pregn-4-éne-3, 20-dione, fait suite à la formation de la 17 hydroxyprogesterone (ou 17α-hydroxy-pregn-4én-3, 20-dione) et aboutit normalement à la synthèse du composé S ou 11 déoxycortisol (ou 17 α , 21-dihydroxy-pregn-4éne-3, 20-dione), puis par hydroxylation en

11β au Cortisol. On aboutit donc à une accumulation des deux précurseurs immédiats : progestérone (où Pregn-4éne-3, 20-dione) et 17 hydroxyprogestérone métabolisés respectivement en pregnanolone (ou 3α-hydroxy-5β-pregnane-20-one) et pregnanediol (où 5β-pregnane-3α, 20α-diol) pour le premier et 17 hydroxypregnanolone (où 3α, 17α-dihydroxy-5β-pregnane-20-one) et pregnanetriol (où 5β-pregnane-3α, 17α, 20α-triol) pour la 17 hydroxyprogesterone.

Ces précurseurs peuvent être hydroxylés en 11 en 21 déoxycortisol (ou 11β,17α-dihydroxy-pregn-4ene-3,20-dione) éliminé dans les urines sous forme de 11 cétopregnanetriol (où 3α, 17α, 20α-trihydroxy-5β-pregnan-11-one), pregnanetetrol (où 5β-pregnane-3α, 11β, 17α, 20α-tetrol) et 11 hydroxy où 11 oxo 17 hydroxypregnanolone.

Mais le bloc enzymatique est rarement complet, et au prix d'une grosse hypersecrétion des précurseurs, et grace à leur accumulation, le bloc est partiellement vaincu assurant [illegible] du cortisol.

II) Forme avec perte de sel - biologie

Mais le bloc en 21 n'intéresse pas que la synthèse du cortisol. En effet la voie de biosynthèse des minéralo-corticoides (Aldostérone) (11β,21-dihydroxy-pregn-4-éne-3, 20-dione-18 al) comprend également une hydroxylation en 21, celle de la progestérone, aboutissant à la formation de désoxycorticostérone ou DOC (21-hydroxy-pregn-4éne-3-20-dione) un chainon de la voie de biosynthèse de l'aldostérone. C'est par le biais d'une synthèse diminuée d'aldostérone qu'on explique les manifestations de perte de sel qui accompagnent un-tiers environ des hyperplasies surrénales par bloc en 21. On invoque en outre le rôle antialdostérone des précurseurs du cortisol en particulier la progestérone et la 17 hydroxyprogestérone qui inhiberait l'action des faibles quantités d'aldostérone formées en cas de perte de sel ; s'il n'y a pas de perte de sel, ce serait en raison du fait que malgré le bloc, la synthèse de l'aldostérone est bien supérieure à l'effet inhibiteur des précurseurs au niveau du tubule rénal.

Clinique :

Sur le plan clinique ses formes sont bien particulières, se révélant chez le nourrisson avant la 7ème semaine, habituellement la 2ème ou la 3ème semaine après la naissance : c'est celui de vomissements répétés, accompagnés parfois de diarrhée, et conduisant rapidement à un état de déshydratation grave, tableau peu spécifique et les risques sont grands d'une erreur diagnostique, d'où la régle pédiatrique de toujours doser sodium et potassium devant une "toxicose", ce qui permet de déceler l'hyperkaliémie et l'hyponatrémie caractéristiques. En effet chez le garçon, le diagnostic est difficile à moins que n'existent des cas identiques, dans la fratrie ; chez la fille, la constatation de malformation des organes génitaux externes donnera une orientation vers l'hyperplasie surrénale à condition bien sûr que la fille n'ait pas été prise initialement pour un garçon cryptorchide comme telle à l'état-civil !

Autres formes de bloc enzymatiques :

D'autres formes, plus rares, de bloc ont été décrites.

- Bloc de la II hydroxylation, dont la clinique est voisine des blocs en 21 avec toutefois un signe supplémentaire l'hypertension. En effet en amont du bloc s'accumulent d'une part sur la voie du cortisol le II déoxycortisol ou composé S, et d'autre part sur la voie d'aldostérone la Déxosycorticostérone (DOC), responsable des chiffres tensionnels par son effet de rétention sodée. Ces deux métabolites sont excrétés sous forme de tétranydrodérivés. Ce tétra S est dosé avec les 17 hydroxycorticoides par la réaction de PORTER et SILBER et l'on a donc la surprise de voir ceux-ci augmentés alors qu'existe un déficit en glycocorticoides.

Par contre, la déficience en 3 β hydroxystéroide déshydrogénase décrite par BONGIOVANNI présente un tableau clinique différent : en effet la synthèse s'arrête à la Delta 5.Prégnénclone, et aucune des trois voies : cortisol, aldostérone et androgènes ne peut être ouverte.

Il n'y a donc pas de virilisation et l'on retrouve alors dans les urines de la delta 5 prégnenolone, de la déhydroépiandrostérone, des dérivés 17, 11 et 21 hydroxylés de la delta 5 prégnenolone.

Il existe d'autres formes encore plus rares : un pseudo stéronisme par déficit de la 18 Oxydation, mais il ne s'accompagne pas d'hyperandrogénie et d'hyperplasie surrénale.

Bloc de la 17 hydroxylation décrit par BIGLIERI et BRUST en 1966 (12), BRICAIRE en 1972 (19), avec hypertension, pseudohermaphrodisme masculin ou aménorrhée primaire du fait du déficit en oestrogènes.

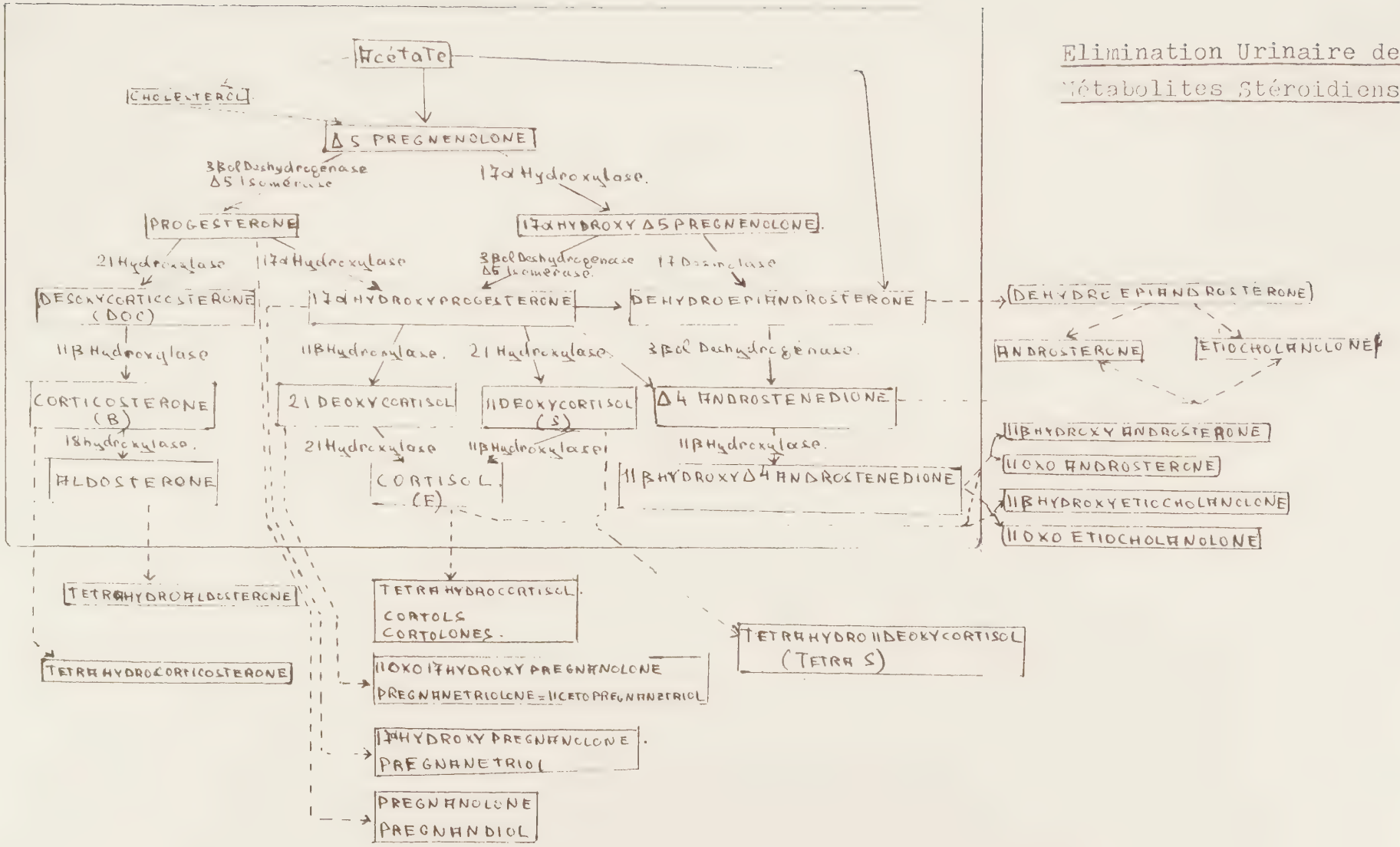
Conclusions :

On conçoit bien que dans tous ces cas, il soit intéressant de posséder une méthode d'exploration des métabolites urinaires qui permette de caractériser les diverses excrétions caractéristiques de chacun des blocs ; chacun se caractérisant par son "empreinte particulière". Cette méthode doit permettre d'explorer simultanément de nombreux métabolites urinaires. Une méthode d'apparition récente, la chromatographie en phase gazeuse, permet d'explorer en une seule manipulation la plupart des stéroides urinaires.

- -

-

Elimination Urinaire des Métabolites Stéroidiens



TECHNIQUE DE LA

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Le principe de la chromatographie en phase gaz-liquide est le suivant :

Les composés du mélange à analyser se répartissent par absorption désorption, en fonction de leur nature, entre deux phases :

- une mobile formée d'un gaz porteur
- l'autre stationnaire, formée d'un mince film liquide couvrant les particules d'une substance neutre poreuse.

En fonction de l'intensité d'absorption sur la phase stationnaire, ces composés vont se déplacer à des vitesses différentes, le long d'un tube rempli par cette phase ou colonne et traversé par le gaz porteur. Ces vitesses sont déterminées par les coefficients de répartition entre phase gazeuse mobile et phase liquide stationnaire ; le passage dans la colonne sera d'autant plus lent qu'une plus grande partie du composé sera absorbé dans la phase liquide stationnaire. La colonne est réalisée en remplissant un tube par une poudre solide inerte imprégnée par un liquide de faible volatilité, ne s'éluant pas aux températures d'utilisation de la colonne pour éviter toute interférence avec la séparation des composés. Idéalement les différents composés du mélange émergent à la sortie de la colonne à des temps différents. Ils sont alors détectés par des moyens physiques ou chimiques, la réponse étant enregistrée. On obtient ainsi sur du papier millimétré une série de pics répartis le long d'un axe du temps longitudinal, chaque pic réprésentant un composé (ou un groupe de composés) ayant même coefficient de répartition entre les deux phases. Le temps écoulé entre l'injection du mélange à une extrémité de la colonne et la sortie d'un composé à l'autre extrémité est défini comme le temps de rétention ; l'aire du pic sera proportionnelle à la concentration du composé dans l'échantillon.

Cette méthode simple dans son principe a comme contrepartie de sa sensibilité importante une absence totale de spécificité.

La chromatographie gaz-liquide, dont nous venons de rappeler le principe, est maintenant devenue une méthode d'exploration fonctionnelle. Il n'en a pas toujours été ainsi et depuis la première application en 1959 de ce procédé à la séparation des hydrocarbures, l'évolution s'est faite en plusieurs étapes plus ou moins intriquées.

La première a vu l'établissement des principes d'utilisation de cette technique.

La seconde, la découverte de relations entre la structure des composés à analyser et leur conduite lors de la chromatographie, permettant l'établissement de lois régissant leur conduite en fonction de leur structure, et de prévoir dans une certaine mesure leur comportement lors de la séparation chromatographique.

L'étape suivante a vu l'amélioration des technologies, par l'usage de procédés divers : programmation de température, amélioration des supports ou des détecteurs, formation de dérivés améliorant la conduite des composés à séparer lors de l'analyse, utilisation de colonnes particulières (capillaires), etc.

Enfin la dernière étape actuelle voit la recherche d'applications cliniques, où l'analyse des stéroides tient une bonne place. En effet dans l'analyse des stéroides la chromatographie gez-liquide présente un certain nombre d'avantages, nous y reviendrons.

ETABLISSEMENT DES PRINCIPES D'UTILISATION -

La réalisation pratique d'une chromatographie en phase gazeuse pose de nombreux problèmes que nous étudierons sucessivement. Tous les facteurs que nous allons envisager les uns après les autres sont susceptibles d'influencer le temps de rétention des composés soumis à la chromatographie, donc d'être à l'origine d'une séparation plus ou moins satisfaisante.

I) Le premier facteur influent est le support

Celui-ci portera la phase liquide non mobile à l'intérieur de la colonne de séparation. On utilise en régle générale un support solide poreux, offrant une grande surface à la phase liquide tout en restant suffisament perméable à la phase gazeuse mobile. La taille des particules composant ce support affecte l'efficacité de la colonne et son débit, d'où son importance. En effet plus les particules (que l'on peut se représenter comme des billes microscopiques et jointives recouvertes d'un mince film de phase liquide) sont petites, plus la surface offerte à la phase stationnaire liquide est grande et l'efficacité de la colonne, exprimée par le nombre de plateaux théoriques, va croître jusqu'à un maximum. Parallélement, la réduction de taille des particules s'accompagne d'une gêne croissante au passage du gaz porteur, dont la vitesse de passage va décroître, à moins que l'on augmente sa pression d'admission.

Ces deux effets opposés sur l'efficacité de la séparation nécessitent un compromis, pour éviter une trop grande chute de pression de gaz porteur dans la colonne qui conduirait à voir une partie de la colonne mal utilisée...

La régularité de la taille des particules du support a également une influence, l'efficacité de la colonne étant plus grande si toutes les particules ont la même taille ou des tailles voisines ce qui peut être obtenu par calibrage et s'exprime par la notion de "mesh" ou réticulation.

Le support doit obligatoirement ne présenter aucune activité vis à vis du fluide à analyser, qu'il s'agisse de catalyse ou d'absorption. En effet une absorption pourrait conduire à une déformation des pics enregistrés sur le chromatogramme, avec évasement de leur base par diminution de la pente de la partie descendante du pic (ou "tailing"). Pour l'éviter on pratique une désactivation du support afin de supprimer d'éventuels sites actifs ; ceci peut être réalisé par lavage acide et alcalin ou par des procédés chimiques, en particulier la formation d'éthers silyl ; d'autres ont proposé de saturer préalablement ces sites actifs par des quantités appropriées du ou des composés à analyser.

Les supports habituellement utilisés sont des terres diatomées, inactivées puis mélangées à la phase stationnaire liquide avant d'être introduites dans la colonne.

2) Le choix de la phase stationnaire liquide à utiliser

Il est fonction des composés à séparer. La phase choisie

- ne doit pas réagir chimiquement avec le soluté à analyser
- doit être stable sur le support et ne pas bouillir aux températures utilisées, ni se cristalliser ou voir sa viscosité augmenter aux températures minimas.
- pour bien séparer des structures très voisines, à température d'ébullition peu différentes, une phase polaire est nécessaire. La phase non polaire sépare bien des solutés non ou peu polaires à températures d'ébullition variées et en fonction de leur poids moléculaire. On a pu d'ailleurs établir une échelle des polarités des différentes phases.
- Le choix est finalement largement une affaire d'expérience et d'essais comparatifs pour établir la colonne la plus efficace en vue de telle ou telle séparation, choix qui ne sera valable que pour le problème considéré.
- On a proposé dans certains cas, pour augmenter l'efficacité de la séparation de mélanger deux phases stationnaires (148).

3) Le pourcentage de phase liquide sur le support

Il doit être soigneusement calculé : l'efficacité de la colonne croît quand ce pourcentage diminue, mais si le pourcentage devient trop faible, on risque de voir cette phase stationnaire liquide trop peu abondante surchargée par le soluté à séparer, avec par voie de conséquence une analyse ininterprétable.

4) La longueur de la colonne

Bien naturellement le nombre de plaques théoriques s'accroît avec la longueur de la colonne, mais jusqu'à une certaine limite, imposée par la chute de pression trop importante de la phase mobile gazeuse; par contre une augmentation de diamètre ne diminue qu'assez peu l'efficacité.

5) Les colonnes capillaires

Une autre voie de recherche a consisté à se passer de support pour la phase stationnaire, ou plus exactement à utiliser comme support les parois de la colonne elle-même : le problème essentiel est alors celui de l'uniformité de la couche de phase stationnaire à la face interne des parois de la colonne (199) (200) (201) (164). On y parvient en utilisant une solution de la phase liquide introduite dans la colonne, puis en faisant évaporer le solvant. Un autre problème imparfaitement résolu est celui de l'introduction de l'échantillon d'analyse qui doit être particulièrement petit pour éviter de saturer la petite quantité de phase stationnaire contenue par la colonne capillaire (201).
Deux méthodes sont possibles :
- soit prélever grace à un système de partage des gaz 1 % de l'échantillon pour l'analyse
- soit utiliser l'injecteur solide de ROSS (163) modifié par VAN DEN BERG-COX (182) dont le principe est d'évaporer une micro-goutte de l'échantillon sur une aiguille de verre dans une chambre fermée au dessus de la colonne ; l'aiguille étant ensuite introduite par gravité au sommet de la colonne. Cette dernière méthode permet de travailler sur le micro-échantillon entier. Ce type de colonne a été couplé au spectrographe de masse par VÖLLMIN (200) et MAUME B.F. et LUYTEN J.A. (131). En dehors de ces inconvénients, c'est un outil de séparation particulièrement puissant pour de petits échantillons.

6) La phase mobile gazeuse

pose également des problèmes. Le choix des gaz possibles reste limité : Hydrogéne, Helium, Argon, Azote, Néon, Gaz Carbonique. Leur pureté doit être soigneusement controlée pour éviter des impuretés à l'origine, soit d'absorption sur la phase stationnaire, soit de réactions avec les composés à analyser. Leur choix est fonction de leur viscosité, elle même variable (elle s'accroît avec la température), tendant à diminuer le débit à pression constante,

de leur diffusibilité : les gaz peu diffusibles Argon, Azote, Gaz carbonique diminuent l'espace occupé sur la colonne par une bouffée du soluté : l'analyse sera plus longue, mais la résolution meilleure ; l'hélium ou l'hydrogène très diffusibles seront préférés si l'on désire une analyse rapide.

Enfin le potentiel d'ionisation du gaz doit dépasser de beaucoup celui des composés à analyser si l'on utilise un détecteur à ionisation.

7) Le débit utilisé

Il est lié à la compressibilité de la phase mobile gazeuse et varie le long de la colonne ; la vitesse linéaire du gaz tendant à s'accroître au fur et à mesure que l'on approche de la sortie de la colonne. Le flux en un point donné varie donc parallélement au gradient de pression par rapport à la pression d'admission, avec la perméabilité du matériel de remplissage, et inversement à la viscosité du gaz. Si l'on calcule la vitesse linéaire du gaz en fonction de la distance à l'entrée de la colonne, pour un rapport donné des pressions d'admission et de sortie, on s'aperçoit que si ce rapport pression d'admission/ pression de sortie est égal à 3, on constate un accroissement rapide de la vitesse linéaire du gaz vers la sortie. Donc la recherche d'un débit à peu près constant d'une extrémité à l'autre de la colonne conduit à réduire au minimum la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne de sorte que le rapport pression d'admission/ pression de sortie soit de l'ordre de 1,5 à 2. Pour diminuer le temps de séjour, une augmentation de la pression d'admission est plus efficace que la diminution de la pression de sortie.

La sélection du meilleur débit est bien souvent matière d'expérience personnelle; c'est un compromis entre une vitesse basse qui décroit l'efficacité de la colonne en élargissant les pics par diffusion moléculaire, et une vitesse élevée qui la décroît également car le soluté ne se séparera alors qu'imparfaitement entre les deux phases.

Dernier problème avec le débit : celui du maintien d'un débit constant en cas de séparation sous programmation de température, qui modifie la viscosité du gaz porteur ;

un dispositif correcteur modifiant la pression d'admission en fonction des besoins est nécessaire.

8) La température d'utilisation

C'est un des paramètres les plus importants :
- si elle est trop basse, les produits ne seront pas élués de la colonne, ou selon des pics trop larges (par diffusion longitudinale dans le gaz porteur pendant la durée de séjour excessive dans la colonne)
- si elle est trop élevée on risque de voir émerger le mélange sans que ses éléments soient séparés. L'idéal réside donc dans une température intermédiaire présentant un pouvoir de séparation et un rendement maximum.

Une augmentation de la température décroit le coefficient de partition du soluté entre les deux phases mobile et stationnaire (une plus grande quantité restant dans la phase mobile). On est donc, pour conserver une résolution satisfaisante, limité dans l'accroissement des températures de travail.

Parallélement, l'efficacité de la colonne croît avec la température, passe par un maximum, puis décroît. Ceci n'implique pas que cette température ou l'efficacité est maximale soit la meilleure pour la séparation envisagée car les facteurs de séparation des différents éléments du mélange varient eux aussi avec la température. La meilleure solution est comme d'habitude un compromis. Enfin dernière exigence concernant la température, ni le solvant formant la phase stationnaire liquide, ni le soluté à analyser ne doivent être instables en raison du risque de contamination ou de créations d'artéfacts à la température utilisée.

9) La programmation de température

Dans le cas de mélanges complexes formés de composés à température d'ébullition très différentes, l'utilisation d'une température constante ne permet pas une séparation satisfaisante. Si l'on choisit une température élevée les composés très volatils ne seront pas séparés ; si on la choisit basse, les composés à point d'ébullition élevés ne seront pas élués ; si elle est intermédiaire les pics

correspondant aux composés à bas point d'ébullition seront très serrés voire se chevaucheront, alors que ceux correspondant aux composés à haut point d'ébullition présenteront des pics anormalement larges en raison d'un séjour prolongé sur la colonne. Le seul procédé satisfaisant est de séparer chaque groupe de composés à la température la plus adaptée à cette séparation, soit en utilisant deux colonnes fonctionnant à des températures différentes, soit en augmentant la température de manière continue ou progressive lors de la séparation, par une méthode de programmation de température. Celle-ci rend nécessaire simultanément, si on veut garder un débit de gaz constant, un dispositif permettant de corriger par une augmentation de la pression d'admission la viscosité croissante du gaz avec la température...

Cette programmation peut se faire par échelons, de manière non linéaire, ou linéairement. Cette deuxième hypothèse posséde l'avantage très important, avec un bon contrôle parallèle du gaz porteur d'obtenir des mesures reproductibles basées sur la surface des pics. Autre avantage des colonnes utilisées en programmation de température, la possibilité d'injecter sans surcharge des échantillons plus importants. L'analyse sera plus rapide, mais le risque d'accumulations de résidus devient plus important.

Le chromatogramme présente, grace à la programmation de température, un aspect plus uniforme, en dispersant les pics apparaissant précocement et en rendant moins larges ceux qui auraient eu des temps de rétention plus élevés à plus basse température.

La programmation de température représente donc un progrès réel en facilitant l'analyse de mélanges complexes aux points d'ébullition largement écartés, ce qui est le cas dans l'analyse des stéroides.

Enfin, nous étudierons deux problèmes : celui de l'introduction des échantillons d'une part et celui de la mesure et de l'enregistrement des résultats. Ces procédés, s'ils n'ont pas une influence directe sur les temps de rétention, n'en ont pas moins une grande importance dans la réalisation pratique de la chromatographie gaz-liquide.

L'introduction des échantillons

Elle représente un des problèmes majeurs, en raison de leur petite taille, et de la nécessité d'une vaporisation rapide (théoriquement instantanée). La méthode la plus simple consiste à introduire l'échantillon grace à une seringue ressemblant à une seringue hypodermique, à travers une diaphragme auto-obturant dans une chambre de vaporisation portée à une température suffisante pour obtenir une ébullition instantanée, cette chambre étant parcourue par la phase gazeuse mobile en amont de la colonne. De plus cette injection doit s'effectuer assez rapidement pour éviter une trop grande diffusion de l'échantillon dans le gaz porteur, qui entrainerait des déformations du chromatogramme. Enfin, dernière condition cette manoeuvre ne doit pas entrainer de destruction des produits à analyser.

En pratique cette injection peut être réalisée grace à une microseringue de HAMILTON avec aiguille hypodermique, permettant de perforer un diaphragme de caoutchouc ou de néopréne, permettant une précision d'injection de l'ordre de 3 %. L'utilisation d'un étalon interne dans l'échantillon à analyser rend d'ailleurs moins essentielle une telle précision dans cette manoeuvre.

D'autres procédés ont pu être décrits, utilisant soit des micropipettes, soit un tube capillaire scellé, soit une injection solide et automatisée (l'injection solide se prête beaucoup plus facilement à l'automatisation) utilisant le dépôt de la solution à analyser sur une microgrille d'où elle sera libérée par chauffage au-delà du point d'ébullition de la solution.

Il faut ensuite éviter, après vaporisation de l'échantillon, qu'il ne se condense en chemin avant d'entrer dans la colonne ce qui conduirait à des pertes (là encore la présence d'un échantillon interne est intéressante). Ceci conduit à une étude des formes de la chambre de vaporisation et des conduits vers la colonne qui ne doivent pas présenter de point froid.

Détection et Enregistrement

On a utilisé pour résoudre ce dernier grand problème, deux grands types de détecteurs au débouché de la colonne (là encore attention aux condensations possibles).

- des Détecteurs Thermiques, robustes, universels, faciles à construire, mais peu sensibles, influencés par les variations de température et de flux de la phase mobile et donc très soumis aux paramètres d'utilisation qui doivent être rigoureusement stables.

- Des détecteurs à ionisation, beaucoup plus sensibles et stables en ce qui concerne les paramètres d'utilisation ; ils répondent à la plupart des composés organiques, mais assez peu aux composés inorganiques (vapeur d'eau). Leur principe est simple : on induit au niveau du composé organique une ionisation, et les ions formés sont utilisés pour porter un courant électrique...

Ces détecteurs permettent d'obtenir un rapport signal/bruit de fond élevé et présentent une moindre sensibilité à de faibles variations de température ou de flux. Ces deux dernières qualités peuvent être considérées comme des avantages pour la détection des composés organiques...

On utilise principalement :

- les détecteurs à l'argon ou le gaz porté à un état métastable par des radiations ionisantes est à l'origine d'électrons secondaires quand il heurte une molécule organique, ces électrons secondaires étant à l'origine d'un courant. Mais leur réponse n'est linéaire en fonction des quantités injectées que dans un domaine trop restreint d'où une diminution de leur utilisation (167).

- les détecteurs à ionisation de flamme à l'hydrogène :

la plupart des composés organiques sont à l'origine d'ions quand ils sont brulés dans une flamme; ces ions soumis à une différence de potentiel sont à l'origine d'un courant électrique facile à enregistrer. La flamme est habituellement alimentée à l'hydrogène, parfois diluée à l'azote pour obtenir un meilleur rapport signal/bruit.

- D'autres détecteurs ont pu être utilisés, en particulier des détecteurs sélectifs d'un type de composés : sensibles aux acides ou aux bases, colorimétriques, biologiques, détecteurs à capture d'électrons utiles pour des composés porteurs d'atomes d'halogénes ou de groupe fonctionnels polaires... De plus d'intérêt sont les procédés de spectrométrie de masse ou de spectrophotométrie permettant par rupture de la molécule de la caractériser sur le plan de sa structure moléculaire spatiale.

Quoi qu'il en soit les deux principales qualités d'un détecteur sont sa sensibilité et son instantanéité de réponse ; sur ces deux points le détecteur à ionisation de flamme utilisé dans notre expérimentation se classe bien...

Ces signaux sont ensuite amplifiés si nécessaire, et enfin enregistrés sur un graphique montrant par la hauteur des pics enregistrés la concentration en fonction du temps. On pourra ainsi définir, pour chacun des composés d'un mélange, son temps de rétention (ou temps mis à traverser la colonne) et également l'importance de la réponse du détecteur au composé considéré (hauteur ou surface du pic correspondant à ce composé du chromatogramme). Ce deuxième paramètre est certes fonction de la concentration du produit, mais également des paramètres techniques utilisés, d'où l'intérêt pratique d'un étalonnage avec des solutions dites standard ou chacun des composés est présent à une concentration connue ; on définit ainsi le "coefficient de réponse" du détecteur au produit considéré. Ce coefficient n'a de valeur que dans les conditions techniques précises réalisées lors du passage de la solution-test. On posséde donc grace à cette méthode la possibilité de réaliser des mesures non plus seulement qualitatives mais quantitatives.

Dans le chapitre qui précéde nous nous sommes servis des références suivantes : (2), (22), (23), (38), (50), (58), (89), (116), (117), (147), (152), (167), (173), (189), (194).

ETABLISSEMENT DE RELATIONS ENTRE LA STRUCTURE DES COMPOSES ET LEUR TEMPS DE RETENTION -

Les mesures sur les chromatogrammes d'abord purement empiriques (on retrouvait sur le chromatogramme un pic au même temps de rétention que le pic d'un composé de référence) ont assez vite conduit à l'établissement de relations entre la structure des composés à analyser et leur temps de rétention. En effet, par exemple pour les stéroides dès 1961 LIPSKY et LANDOWNE (121) avaient établi que leur ordre d'élution dépendait certes du contenu de la molécule en carbone et en oxygéne : il existe une relation linéaire entre le logarithme du temps de rétention et le nombre d'atomes de carbone pour les hydrocarbures stéroidiens, mais également des groupes fonctionnels portés par elle, de leur position et de leur configuration stéréochimique. Enfin l'introduction d'une double liaison entre deux carbones peut raccourcir le temps de rétention si elle intéresse les cycles C et D l'allonger s'il s'agit des cycles A et B.

En 1962 VAN DEN HEUVEL et HORNING (184) partant de ces constatations ont pu définir un "nombre stéroidien" "stéroid number" qui est calculé sur une phase non sélective (c'est-à-dire une phase telle que les groupes fonctionnels portés ne modifient que peu ou pas le temps de rétention) par rapport à des nombres de référence correspondant au temps de rétention de composés stéroidiens saturés : androstane à 19 carbones, cholestane à 27 carbones. Ce nombre stéroidien permet d'établir la taille de la molécule considérée, et a l'intérêt par rapport aux temps de rétention relatifs (rapport du temps de rétention du stéroide X à celui du stéroide de référence) d'être relativement moins dépendant de la température de fonctionnement de la colonne que celui-ci. (Tout ceci vaut pour un type de colonne bien précis, non sélective).

Parallélement, ils définissent un nombre T qui correspond à un rapport de la différence des temps de rétention d'un stéroide X porteur d'un groupe fonctionnel sur phase sélective et non sélective au temps de rétention du même stéroide X

sur la phase sélective. Ce nombre T varie bien avec la température, mais surtout avec le groupe fonctionnel considéré, sa nature, sa position, ses relations stéréochimiques avec les fonctions voisines, permettant des déductions à propos de la disposition des groupes fonctionnels d'un stéroide inconnu.

KNIGHT et THOMAS définissent le Δ R mg qui correspond à l'accroissement logarithmique lié à la présence d'une fonction supplémentaire par rapport au logarithme du temps de rétention d'un stéroide de base.

Enfin KOVATS introduit la notion d'indice de rétention I toujours exprimé en logarithme et qui compare la différence du volume de rétention d'un stéroide X et du volume de rétention spécifique de l'alkane de la série $C^n H_2^{n+2}$ à la différence des volumes de rétention spécifique des 2 alkanes de la série considérée qui l'encadrent. Cet indice de rétention s'exprime habituellement en unités méthylène qui est son multiple par 100. VAN DEN HEUVEL et HORNING préconisent eux-mêmes en 1966 (186) l'usage "des unités méthyléne" à coté du nombre stéroidien.

L'intérêt de cette notion d'indice de rétention pour DEHENNIN et SCHOLLER (45) c'est d'être la valeur de rétention la moins sensible aux variations de température de la séparation, donc la plus susceptible d'échanges inter-laboratoires.

On a pu établir un tableau des incréments Δ I dus à l'introduction d'un groupement fonctionnel ; à une épimérisation ; à la réduction d'une fonction, voire à l'aromatisation du cycle A, cet incrément étant fonction de la phase utilisée.

On peut donc utiliser ce concept pour établir des corrélations entre la structure du stéroide et ses propriétés en chromatographie, permettant soit de prévoir le temps de rétention d'un stéroide donné, soit, ce qui est beaucoup plus intéressant, d'essayer, à partir du temps de rétention, de déduire la structure d'un stéroide.

Enfin, les deux dernières étapes de l'évolution de la chromatographie gaz-liquide : améliorations technologiques et recherches d'applications cliniques, ont été menées parallélement. Nous nous intéresserons exclusivement aux développements concernant directement l'analyse stéroidienne.

AMELIORATIONS LIEES A L'USAGE DE LA CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE DANS LA SEPARATION DES METABOLITES URINAIRES DES STEROIDES -

Au total, et malgré la diversité des procédés employés, la chromatographie représente par rapport aux procédés utilisés antérieurement, un certain nombre d'améliorations. En effet tous les cliniciens sont conscients de l'insuffisance des renseignements fournis par un examen aussi peu spécifique que la mesure des 17 Oxo-stéroides. L'index de II Oxygénation lui-même ne peut prétendre malgré le progrès qu'il représente, différencier les différents types de bloc enzymatique. D'où l'intérêt, suscité depuis longtemps, des différents procédés d'isolement dans les urines des métabolites des stéroides, en particulier des pregnanestéroides et des 17 Oxostéroides. Les procédés utilisés ont été nombreux, chromatographie sur papier, sur colonne, colorimétriques, mais tous avaient en commun une technologie particulièrement délicate, nécessitant un personnel entrainé pour réaliser les multiples séparations en série nécessaires. En outre ces séparations exigeaient un matériel important et des durées d'examen prohibitives sans assurer pour autant, en raison de la multiplicité des manoeuvres subies par l'échantillon, un rendement satisfaisant.

La chromatographie gaz-liquide a permis de surmonter la plupart de ces difficultés, en raison de ses qualités propres par rapport aux autres procédés de séparation chromatographiques qui sont déjà pour la plupart, fidéles, reproductibles et précis permettant souvent un travail quantitatif :

Elle est plus efficace, car l'équilibre entre les deux phases mobiles et stationnaire intervient plus rapidement pour les différents composés du soluté à analyser.

Elle est plus rapide, malgré la longueur des colonnes, en raison de la basse viscosité de la phase mobile gazeuse.

La température de travail peut être plus élevée : pas d'ébullition ni de gel dans la mesure où les composés à analyser restent eux-mêmes stables. Des circuits plus complexes sont possibles, tout en se méfiant des condensations au niveau des zones froides.

Des échantillons plus petits peuvent être utilisés en raison de l'efficacité de la méthode, ce qui est un avantage important en clinique, et permet de répéter les mesures sur le même échantillon.

Enfin le recueil des métabolites séparés à l'extrémité de la colonne est beaucoup plus facile que sur une séparation sur colonne ou sur papier, ce qui permet par exemple de coupler la chromatographie gaz-liquide à une spectrographie de masse des composés séparés. De même la variété des détecteurs possibles est beaucoup plus importante en chromatographie gazeuse.

Elle sépare mieux les composés épimériques que les autres types de chromatographie.

Sur le plan pratique, la chromatographie en phase gazeuse est de maniement beaucoup plus facile et rapide, ce qui conduit à une bonne répétabilité des analyses même en des mains moins expertes.

Le principal inconvénient réside dans l'absence de spécificité de la méthode, rendant nécessaire un bon étalonnage, avec une solution standard ou son couplage avec une méthode spécifique telle la spectromètre de masse.

On a mis en compétition avec la chromatographie les dosages radio-immunologiques, aussi sensibles et plus spécifiques, mais, rançon de leur spécificité, ils ne permettraient de mesurer les différents métabolites qu'un par un ce qui obligerait à mettre au point une batterie de tests pour les stéroides urinaires. Par ailleurs il n'est pas sûr que l'on puisse obtenir des anticorps absolument spécifiques pour des stéroides isomères par la position d'un H par exemple. Les méthodes de liaison compétitives, auxquelles s'appliquent les remarques précédentes, nécessitent un matériel jetable et surtout des mesures multiples pour assurer la fiabilité : au total l'intérêt pratique de ces procédés apparaît modeste dans le cas précis de la détermination de nombreux métabolites stéroidiens urinaires.

\- \-

\-

PROBLEMES PRATIQUES POSES PAR L'APPLICATION DE LA METHODE A L'ANALYSE STEROIDIENNE

DIFFICULTES LIEES A UN TRAVAIL QUANTITATIF -

Dans l'analyse des stéroides urinaires en biologie humaine, on concoit l'importance fondamentale de mesures qui ne soient pas seulement qualitatives, mais quantitatives permettant d'évaluer les concentrations relatives des différents composés. La chromatographie gaz-liquide se prête assez bien au travail quantitatif à une condition essentielle: la linéarité de la réponse du détecteur. En effet il doit exister une relation linéaire entre d'une part la quantité de composé injecté et d'autre part la réponse de l'ensemble colonne, détecteur, électromètre, enregistreur et même à un degré de plus entre la quantité présente dans l'urine et la réponse enregistrée. Celle-ci se présente sous forme de pics du chromatogramme, repérés par le temps écoulé à partir de l'injection du mélange ou temps de rétention, et dont on peut mesurer soit la surface, soit beaucoup plus simplement la hauteur. Celle-ci constitue toutefois un critère moins fidèle, étant sensible aux variations de débit de gaz porteur.

La linéarité dépend bien sûr du détecteur et ainsi l'on préfère les détecteurs à ionisation de flamme qui donnent une réponse linéaire dans une zone de concentration très étendue aux détecteurs à ionisation d'argon dont la bande d'emploi est plus limitée. Mais vont influer également :

- l'extraction des stéroides du liquide biologique plus ou moins quantitative,
- l'hydrolyse complète des conjugués stéroidiens
- la présence d'impuretés
- l'injection dans la colonne du soluté à analyser : une erreur minime dans la quantité injectée peut être à l'origine d'erreurs importantes sur les résultats - de même une purge incomplète après une première analyse de la chambre de vaporisation où a lieu l'injection peut être à l'origine d'erreurs sur une deuxième mesure,
- l'absorption de composés sur le support contre laquelle on luttera par la désactivation de ce dernier, voire une saturation préalable par le composé à analyser.

Pour diminuer ces aléas importants, et permettre la définition de facteurs de réponse constante ou à peu près constants, deux solutions peuvent être proposées, outre un soin particulier dans les manipulations techniques :

I) LA FORMATION DE DERIVES

Elle a le double intérêt de diminuer l'absorption, au niveau de la colonne, et dans le cas exemplaire des éthers triméthyl silyl des fonctions hydroxyles d'augmenter la réponse du détecteur en accroissant par la formation du dérivé la masse du composé à analyser. Mais elle posera le problème supplémentaire de la formation à 100 % ou non des dérivés du composé à analyser. Nous y reviendrons...

II) L'UTILISATION DE L'ETALON INTERNE

Il s'agit d'un composé de structure voisine du composé à mesurer, mais nettement distinct de lui par son temps de rétention, et impérativement n'étant pas présent dans le mélange à analyser. On l'introduira donc dans ce dernier, à une concentration voisine de celle supposée au corps à mesurer, Il permettra, en rendant possible l'établissement d'une proportionnalité de réponse du détecteur entre lui et le composé à mesurer, d'éviter les erreurs liées à l'injection, plus ou moins reproductibles en microméthodes, dans la colonne, à l'absorption sur le support, à la reprise d'extraits, aux variations de concentrations des solutions, à la formation incomplète des dérivés (sous réserve que l'étalon interne soit lui-même susceptible d'en former).

En effet le coefficient de réponse ou rapport des réponses du détecteur à l'étalon et au composé à mesurer reste constant quelle que soit la quantité injectée et le volume final de l'échantillon permettant dès lors une étude quantitative précise à partir de la quantité connue d'étalon interne ajoutée à la solution à analyser. La définition de ce coefficient de réponse pour chaque stéroide par rapport à l'étalon interne sera assurée par l'injection d'une solution standard contenant des quantités connues d'étalon interne et des différents stéroides à mesurer et mesure des rapports des différentes réponses du détecteur (à savoir l'aire ou plus simplement la hauteur des pics correspondants) par

rapport aux quantités injectées. De telles mesures devront être fréquemment répétées pour réaliser un travail quantitatif, afin de s'assurer de l'absence de variations du coefficient de réponse liées à des modifications même minimes des conditions de séparation, toujours possibles surtout si l'on change de manipulateur.

Mais même l'usage de l'étalon interne n'est pas la panacée et il peut exister des variations mineures, en fonction des conditions d'utilisation des concentrations relatives d'étalon interne et des composés à mesurer dans une solution donnée. Mais ces variations restent modestes au regard des variations de rendement obtenues par l'hydrolyse des conjugués et par l'extraction, rendements qui ne dépassent pas 85 % à 80 % et varient en fonction de la nature des stéroides.

La notion d'étude quantitative reste en biologie empreinte d'une certaine relativité mais qui est également valable pour les autres procédés de séparation des stéroides.

AMELIORATIONS DE LA TECHNOLOGIE

La première application de la chromatographie en phase gazeuse à l'analyse des stéroides remonte à 1960 par VAN DEN HEUVEL et HORNING sur une phase stationnaire SE 30. Dès cette époque, ils constatent la destruction par la chaleur de la chaine dihydroxyacétone liée au C 17 des glycocorticoides.

En 1961 COOPER et CREECH (37) se servent de la chromatographie gaz-liquide pour séparer l'androstérone ou 3 α-hydroxy-5 α-androstane -17-one, l'étiocholanolone ou 3 α-hydroxy-5 β -androstane -17-one et la déhydroépiandrostérone ou 3 β- hydroxyandrost -5 en -17-one. Il leur faut dans ce but combiner deux séparations sur des colonnes différentes : SE 30 1,5 % qui ne sépare pas la déhydroépiandrostérone et l'androstanolone, et NGS 0,75 % (Néopentyl glycolsuccinate) qui ne sépare pas androstérone et étiocholanolone. En fait c'est en 1962 qu'apparait le progrès décisif permettant une bonne séparation de l'androstérone, de

l'étiocholanolone et de la déhydroépiandrostérone : c'est l'usage, préconisé par VAN DEN HEUVEL et HORNING, des éther triméthyl silyl (184). Ceux-ci permettent une amélioration de la séparation des différents pics, une augmentation de la réponse, une diminution des temps de rétention sur SE 30 1,5 %. Les dérivés trifluoroacétyls donnent de moins bons résultats ; enfin une séparation préalable sur une colonne de florisil proposée, par ces auteurs n'est pas indispensable si l'on ne sépare que le prégnandiol et les 17 Oxostéroides. Cette meilleure séparation des dérivés silyl est confirmée la même année par SPARAGANA.

En 1963, KIRSCHNER et LIPSETT (113) utilisent une phase stationnaire QF1 à 1 % à 185° sous 25 ml/mn d'argon pour séparer les éthers triméthylsilyl des 17 Oxostéroides, après chromatographie préalable en couche mince sur silice avec un solvant benzéne-éthyl-acétate. Ils obtiennent ainsi une réponse linéaire pour des quantités de stéroides allant de 0,5 microgrammes à 3 microgrammes. La précision atteint 5 %, le rendement 96 %, la méthode étant reproductible, fiable, spécifique et relativement simple. Il s'agit là de la première méthode réellement applicable en clinique.

La même année HORNING et VAN DEN HEUVEL dans un article théorique (91) mettent en valeur l'intérêt pour des mesures quantitatives de certains points de technologie, en particulier l'avantage que l'on pourrait tirer de la programmation de température dans la séparation des stéroides dont elle augmente la rapidité, de l'utilisation d'un standard interne dans l'échantillon à analyser, enfin du calcul à partir de solution standards de facteurs de réponse..

En 1964, CREECH sépare sur une même colonne NGS à 2 % à 210° les 17 Oxostéroides le pregnandiol et le pregnanetriol, avec comme standard interne le coprostanol avec une bonne fiabilité. Il pose pour la première fois le problème de l'hydrolyse compléte des composés stéroidiens conjugués (39).

L'année suivante FRANCE, MAC NIVEN et DORFMAN (64) font précéder leur chromatographie sur XE 60,2 à 3 % à 218° par une chromatographie préalable sur gel de silice et de la formation d'éthers triméthylsilyl, obtenant ainsi une méthode

sensible, fiable, reproductible, précise de séparation des II-déoxy-17-Oxostéroides. Par un changement de la chromatographie préliminaire (double séparation sur alumine) et par utilisation d'une autre phase stationnaire DC 200 à 1,5 % à 222° Ils réussissent à séparer le pregnandiol, le pregnanetriol et la pregnanetriolone (154). Malgré son caractère sensible et reproductible, la méthode reste lente (4 jours) et son rendement ne dépasse pas 70 à 80 %.

Toujours en 1965, MENINI et NORYMBERSKI proposent une autre méthode de stabilisation des stéroides avant la chromatographie en les transformant en leurs dérivés oxydés, par usage sucessif du bismuthate de sodium et du tert butyl chromate. Nous en reparlerons (133).

En 1966, GARDINER et HORNING (69) mettent en évidence pour la première fois l'intérêt de la formation de dérivés ométhyloximes triméthylsilyl des stéroides. En effet, sous cette forme, tous les stéroides, y compris ceux présentant une chaîne latérale dihydroxyacétone en C 17, sont stables dans les conditions de la chromatographie en phase gazeuse. On sépare ainsi sur une colonne SE 30 à 1 % de 12 pieds en programmation de température de 190° à 250°, à raison d'un degré par minute, les 17-Oxostéroides, à l'exception des II Oxo-étiocholanolone et Androstérone mal séparés, le pregnandiol le pregnanetriol et les 17-Hydroxy Corticoides : cortols, cortolones, tetrahydrocortisone et cortisol. Cette séparation peut même être utilisée à des mesures quantitatives si l'on détermine le coefficient de réponse du détecteur pour chaque stéroide.

La même année KINOSHITA, ISURUGI, KUNAMOTO et TAKAYASU (110) reprennent la technique utilisée en 1962 par VAN DEN HEUVEL, en remplaçant la séparation préalable sur gel de silice par une chromatographie sur colonne d'alumine. Ils séparent ainsi sur SE 30 à 1,5 % le pregnanetriol, la pregnanetriolone, le pregnanetetrol qu'ils trouvent tous trois augmentés dans l'hyperplasie surrénale congénitale. Toujours en 1966, BERRET et NEIL proposent (10), après purification en couche mince sur gel de silice, puis

formation d'éthers triméthylsilyl, d'utiliser une colonne contenant 2 % de GEXE 60 et parcourue par de l'argon. On obtient ainsi une séparation de l'androstérone, de l'étiocholanolone et de la déhydroépiandrostérone avec un rendement approchant les 85 %.

En 1967, RIVERA, DORFMAN, FORCHIELLI (159) proposent de séparer sur une même colonne XE 60, mais à des températures différentes, les 17-Oxostéroides et les dérivés du pregnane. La méthode qui est spécifique, sensible et reproductible n'a malheureusement qu'un rendement de 65 à 72 % ; elle utilise une purification préalable sur colonne de silice et la formation d'éther triméthylsilyl.

Après revue des différents procédés et types de phases stationnaires disponibles HEYNS (89) propose personellement l'utilisation, après chromatographie sur colonne d'alumine et silylation, d'un mélange de phases stationnaires XE 60 à 0,6 % et SE 30 à 0,35 % à 205° sous azote, qui leur permettent d'obtenir des rendements nettements supérieurs (70 à 80 %). La mesure du pregnandiol et du pregnanetriol est là encore possible à des températures plus élevées. Par contre HORNING, CHAMBAZ et BROOKS (93) après revue des diverses phases possibles, préférent introduire deux nouvelles phases : OV 1 non sélective, voisine de SE 30, polymére de méthylsiloxane et OV 17 sélective, polymére de phénylméthylsiloxane dont le principal avantage est une stabilité thermique accrue permettant l'usage sans "coulage" de températures plus élevées. Ils les proposent pour séparer les stéroides OV 1 et OV 17 à 1 % en programmation de température à partir de 160°. Ils insistent sur l'intérêt pour un travail quantitatif d'un standard interne, de dérivés stéroidiens, d'une bonne inactivation du support de la phase stationnaire et discutent de l'intérêt des relations structures temps de rétention pour la caractérisation des stéroides.

Enfin toujours la même année, CHATTORAJ et SCAMONEGA (32) parviennent à un rendement de 98 % pour le pregnandiol grace à une précipitation préalable par le sulfate d'ammonium à 70 % avant l'hydrolyse, précipitation qui débarasserait l'urine de ses inhibiteurs enzymatiques. Ils

utilisent des dérivés acétates des 17-Oxostéroides du pregnandiol et du pregnanetriol sur SE 30 à 3 % et à 250°.

En 1968, KITTINGER (114) reprend en l'améliorant le procédé de stabilisation par l'oxydation de MEMINI et NORYMBERSKI. Malheureusement le procédé est complexe et comprend trois chromatographies en paralléle sur trois colonnes différentes !.

La même année MAKIN (124) propose d'appliquer la chromatographie gaz-liquide au calcul de l'index de 11 Oxygénation. Sur une phase SE 30 à 3 % on calcule le rapport 11-hydroxyétiocholanolone / étiocholanolone qui sont les principaux produits d'oxydation ; ce rapport remplace l'habituel des 11 Oxy 17 Oxostéroides aux 11 Désoxy.

Enfin KINOSHITA, ISURUGI et TAKAYASU estiment (111) après séparation préalable sur colonne d'alumine et formation d'éthers triméthylsiliyl, le $\Delta 5$ pregnénetriol, le pregnandiol et les 11-Oxy-17-Oxostéroides sur SE 30 à 1,5 %, avec un rendement de 81 %.

En 1969, PINELLI et NAIR (148) améliorent leur colonne faite d'un mélange de deux phases stationnaires SE 30 - NGS en utilisant le mélange SE 30 - TMBCA qui résiste beaucoup mieux aux hautes températures ; ils séparent ainsi les 17 - Oxostéroides puis les Oestrogènes sous forme d'éther triméthylsilyl.

On note un nouveau progrés important en 1970 : l'utilisation par VOLLMIN (200) de colonnes capillaires pour séparer les stéroides urinaires, permettant d'éliminer du même coup toute purification préalable. La séparation est réalisée sous forme d'éthers triméthylsilyl ou de Méthoximes éthers triméthylsilyl sur une phase stationnaire silicone OV 101 dans une colonne de 20 mètres de long et 3 mm de diamètre, sous courant d'Hélium de 2 ml/mn et grace à une programmation de température de 3°/mn après un palier initial de 10 minutes à 160°, le [illegible] jusqu'à 230°. Le problème de l'injection semble avoir été résolu, permettant une analyse quantitative extrémement sensible, sans pertes importantes.. Il améliorera encore son procédé l'année suivante, (201) en utilisant les mêmes paramètres mais avec une phase stationnaire SF 96, et une programmation de température de 2,5°/mn

jusqu'à 240°. Le rendement atteint 90 à 100 %, mais le gros reproche à faire à cette méthode concerne la reproductibilité des expériences, nettement inférieure à celle des colonnes pleines, pouvant atteindre jusqu'à ± 25 % pour l'androstérone, 15 à 20 % en moyenne. Une telle incertitude sur le résultat est difficilement acceptable en clinique.

La même année, MEMINI (136) fait une revue des principales méthodes de détermination des stéroides en chromatographie en phase gazeuse. Il insiste sur la nécessité d'assurer la stabilité des stéroides, soit par oxydation en composés stables, soit en formant des dérivés aux premiers rangs desquels il met les éthers triméthylsilyl ; nous reviendrons sur ce problème.

Toujours en 1970, BEALE, CROFT et TAYLOR (8) améliorent également la méthode de NORYMBERSKI en utilisant une extraction plus efficace des stéroides par le mélange tétrahydrofurane-éther 1:3.

En 1971, à deux reprises HORNING (96, 97) propose une séparation par gaz chromatographie à deux étapes : une première effectuée sur SE 30 à 5 % de 6 pieds, colonne de haute capacité mais de faible résolution sert à isoler l'échantillon à analyser, cet échantillon étant repris par une deuxième colonne SE 30 à 1 % de 12 pieds travaillant en programmation de température, de faible capacité mais de haute résolution qui assurera la séparation individuelle des composés. Pratiquement cela pourrait être réalisé en trois étapes : la première sur la colonne à haute capacité éliminant le solvant et les produits les plus volatils.
Puis la deuxième étape par un reflux rapide vers la deuxième colonne de faible capacité et de forte résolution qui dans une troisième étape assurerait la séparation d'un échantillon purifié.

En 1972 PINELLI et FORMENTO (150) proposent une application de la méthode décrite en 1969 par PINELLI utilisant une phase stationnaire faite d'un mélange SE 30 et TMBCA à 230° après purification préalable soit en couche mince sur silice avec repérage grace aux colorants azoïques, soit sur colonne d'alumine, et formations de dérivés silyl : cette technique obtient un rendement total très favorable de 91 à 96 %.

EXTRACTION DES STEROIDES

C'est un des problèmes les plus délicats de l'analyse des stéroides et la multiplicité des procédés employés révéle bien qu'aucun n'est parfaitement satisfaisant. On cherche grace à ce procédé à enrichir au maximum l'extrait en stéroides - voire à les récupérer en totalité -, tout en éliminant le maximum des autres composés contenus dans le prélévement à analyser. Cette opération peut s'effectuer certes sur des urines brutes, mais également sur des urines déjà traitées, et en particulier après hydrolyse libérant les stéroides de leurs conjugaisons.

De nombreux solvants ont été utilisés :

- l'éther par KIRSCHNER et LIPSETT en 1963 (113) pour les 17 Oxo-stéroides, mais avec une purification ultérieure en couche mince sur silice, aboutissant à des rendements de l'ordre de 100 %. SPARAGANA, KEUTEMAN et MASON employent également ce procédé (174). KINOSHITA, ISURUGI, KUNAMOTO, TAKAYASU (3) (110) associent à cette extraction par l'éther un lavage alcalin éliminant les oestrogénes et une élution sur colonne d'alumine avec divers systèmes de solvants éthanol-benzéne pour récupérer le pregnandiol et le pregnane triol. Enfin VÖLLMIN utilise l'éther après hydrolyse enzymatique et avant un lavage alcalin pour préparer sa séparation des stéroides sur colonne capillaire (200).

- le chloroforme a été proposé par MEMINI et NORIMBERSKI pour extraire les stéroides non conjugués, où les sulfates et une partie des glycuronides après addition préalable de sulfate de pyridinium en 1965 (133).

- l'éthyl-acétate a été utilisé par le même MEMINI après hydrolyse enzymatique glycuronides (133). VOLLMIN en 71 le réemploie (207) à 3 reprises, suivi d'un lavage alcalin. En 1970 CHATTORAJ, PINKUS, WOTIZ (31) utilisent le même solvant à 3 reprises pour extraire quantitativement les conjugués stéroidiens, après avoir porté l'urine préalablement à 3 N de chlorure de sodium et à 0,5 N de sulfate de pyridinium.

- le DICHLOROMETHANE a été utilisé en 1965 par ROMAN, AVRAMOV, MAC NIVEN, DORFMAN (7) pour extraire le pregnandiol,

le pregnanetriol et la pregnanetriolone des urines après hydrolyse enzymatique ; cette extraction est suivie d'une chromatographie en couche mince sur alumine par 2 mélanges éthanol-benzéne. KITTINGER l'utilise également en 1968 (114) pour extraire après réaction avec l'acide périodique les dérivés stéroidiens.

- le tétrahydrofurane a été proposé par BEALE, CROFT et TAYLOR en 1971 (8) en combinaison avec l'éther dans la proportion 1/3 à l'origine d'extraits peu abondants en produits non stéroidiens et riche en stéroides y compris les plus polaires: l'usage de cette extraction élimine la nécessité d'utiliser une purification chromatographique ultérieure. BERRET et NEIL antérieurement en 1966 avaient proposé (10) après saturation des urines par le sulfate d'ammonium son utilisation. Cette extraction précédait l'hydrolyse, une nouvelle extraction par l'éther, une chromatographie en couche mince sur silice, (éthyl-acétate-benzéne) l'ensemble aboutissant à un rendement de 85 %. On a proposé également :

- le norbutanol
- l'éthanol
- l'éther-éthanol

voire une précipitation par le sulfate d'amonnium à 70 % du pregnandiol et du pregnanetriol, suivie d'extraction par le diéthyl-éther (32).

Dans notre expérimentation, une double extraction par le benzéne après l'hydrolyse enzymatique, elle-même précédée d'une précipitation par l'acétate de Barym, a permis d'obtenir pour les 17 Oxo-stéroides et plus précisément pour la Déhydroépiandrostérone marquée un rendement de 85 % $\pm$ 6 % sans qu'une extraction supplémentaire par le benzéne améliore le rendement. Par contre une troisième extraction par un mélange éther-éthanol 3/1 a permis d'augmenter de 12 et 23 % les pourcentages d'extractions des pregnanestéroides (pregnandiol 20 α et pregnanetriol 20 α) qui atteignent alors 80 % et plus : elle a donc été retenue dans le procédé expérimental. Ces résultats sont comparables au rendement obtenu dans la littérature, avec des procédés d'extraction beaucoup plus complexes, certains comprenant même plusieurs chromatographies.

COMPARAISON DES DIVERS PROCEDES D'HYDROLYSE

L'hydrolyse acide des conjugués stéroidiens contenus dans l'urine, malgré son caractère rapide et pratique, a dû être rapidement abandonnée en raison de la formation d'artefacts et de la destruction de certains 17 Oxostéroides (déhydroépiandrostérone DHA et 11 β hydroxyandrostérone et 11 β hydroxyétiocholanolone).

En 1958 a alors été mis au point par BURSTEIN et LIEBERMANN (24) un procédé de solvolyse utilisant une hydrolyse en phase éther saturée par l'eau, l'extraction des stéroides de la phase aqueuse (l'urine) se faisant d'autant mieux que la concentration en acide dans cette phase augmente. Il donne un résultat quantitatif en 48 heures dans l'éther, en 24 heures à 38 degrés C dans l'acétate d'éthyl. Ce procédé simple est relativement rapide mais présente une lacune majeure : il n'intéresse que les sulfates stéroidiens et non les glycuronides.

Ce procédé de solvolyse a été plusieurs fois amélioré par LIEBERMANN puis par DE PAOLI, EIKNES et NISHIZAWA en 1963 (46) : ils ont proposé une solvolyse par l'acétate d'éthyl ou par le tétrahydrofurane sec en présence d'acide perchlorique. La méthode est très rapide (1 heure), à l'origine de peu d'artéfacts et intéresse à la fois sulfates et glycurorides. Toutefois on a signalé la présence de pics secondaires de TR différents en chromatographie gaz-liquide : dérivés acétates ? Ce procédé a l'inconvénient majeur de détruire le pregnanetriol et la pregnanetriolone, métabolites importants dans les hyperplasies surrénales.

L'hydrolyse enzymatique permet de bien hydrolyser les glycuronides, à condition d'employer des concentrations d'enzyme suffisantes mais les sulfates sont moins bien clivés par les sulfatases. De plus ce procédé est lent (48 heures et plus) et cher.

En 1967 CURTIUS et MILLER (40) ont fait une revue des divers procédés d'hydrolyse des 17-oxostéroides et des métabolites de la progestérone.

Ils préconisent la méthode utilisant une combinaison de l'hydrolyse enzymatique par la β-glucuronidase et d'une extraction continue par l'éther à Ph 0,8 durant 72 heures, procédé qui donne le meilleur rendement, puis l'hélicase, 24 heures à 50 000 U puis 25 000 U pour 50 millilitres pendant les 24 heures qui suivent, vient immédiatement après : pas de produits de décomposition - mais quelques pertes par formation d'émulsions à Ph 5,2. Le rendement est moins bon pour l'androstérone et ses dérivés 11-hydroxy et 11-Oxo.

Par contre on déconseille :

- l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique qui décompose le pregnanetriol et la pregnanetriolone.
- l'hydrolyse par la β-glucuronidase qui se limite aux glucuronides.
- l'hydrolyse par la β-glucuronidase combinée à la solvolyse par H_2SO_4 dans l'acétate d'éthyl : rendement insuffisant avec pic correspondant à un produit non identifié.

.dans le tétrahydrofurane : bon rendement, mais décomposition partielle avec apparition d'un pic non identifié avec le temps de rétention de la dé hydroépiandrostérone.

.l'acide perchlorique dans le tétrahydrofurane ou dans l'acétate d'éthyl, du fait de l'apparition de pics supplémentaires.

- Par contre, la même année, VAN DEN HEUVEL (188) obtient des rendements de l'ordre de 99 % par une hydrolyse enzymatique avec des taux élevés d'enzymes à Ph 5,45, 24 heures à 37° (4 000 u F et 2 000 u W/ml), soit 125 microlitre de suc d'Hélix Pomatia pour 5 ml d'urine + 0,5 ml de tampon acétate (le taux élevé d'enzymes utilisé compenserait la faible activité de la sulfatase sur le sulfate de DHA) : ceci n'est possible que pour de faibles quantités d'urines ; la présence d'inhibiteurs enzymatiques n'aurait jamais été prouvée sauf pour les glucuronides d'oestrogènes : (inhibiteur endogène la saccharolactone enlevée par filtration sur gel).

En 1969, BEALE et CROFT pratiquent une étude à la recherche des conditions optima d'hydrolyse enzymatique(7).

Ils obtiennent un rendement quasi quantitatif avec de la β-glucuronidase sauf pour les sulfates de déhydroépiandrostérone et d'androstérone, qui ne seront pas hydrolysés. L'hydrolyse des 5 β-stéroides est maximale au-dessus de 450 Fu/ml et pour les 5 α-stéroides à des concentrations plus élevées de 450 à 1 300 Fu/ml.

Avec 700 Fu/ml on obtient en 32 heures plus de 95 % de clivage des principaux stéroides conjugués. Le meilleur rendement de l'hydrolyse est obtenu à 47° plutôt qu'à 37° : au-dessus de 50° le rendement baisse par destruction de l'enzyme ; le Ph d'hydrolyse le plus favorable est 5.

De plus on confirme l'absence d'inhibiteurs enzymatiques dans l'urine, puisque l'on ne relève aucune différence entre l'urine et un milieu aqueux comme milieu d'hydrolyse.

Pour hydrolyser 95 % du glucuronide de 11 β-hydroxyandrostérone (le moins bien hydrolysé) avec 900 u Fu/ml et à Ph 5, 24 heures sont nécessaires à 52° C, (le stéroide le plus rapidement hydrolysé est libéré dans les mêmes conditions en 4 heures) dans l'urine de sujets normaux non traités : le clivage est donc quasi complet dans ces conditions pour les glycuronides.

Aucune amélioration de rendement ne peut être attendue en accroissant le taux de l'enzyme au-delà d'un certain niveau.

Le gros problème de l'hydrolyse enzymatique, outre son prix de revient, et sa durée, reste la difficulté du contrôle de qualité (activité et spécificité) de la préparation enzymatique ; de plus lors de son mélange avec l'urine il y a possibilité de combinaison avec l'urée et les protéines, s'il y en a dans les urines.

Enfin une amélioration de l'hydrolyse acide, décrite en 1971, permettrait d'éviter une dégradation secondaire des stéroides libérés par une reprise immédiate de ces derniers par le fluide d'extraction qui présente une densité inférieure à 1,2. Mais dans ce cas encore le pregnanetriol est détruit à 70, 80 %.

Enfin un dernier article (150) de PINELLI et FORMENTO publié en 1972 soutient que, même dans les meilleurs conditions de clivage enzymatique (5 000 Fu β-glucuronidase et 25 000 W d'Arylsulfatase incubé 24 heures à 37° et à Ph 5,5) pour 5 ml d'urine la rupture de certains sulfates de stéroïdes n'est pas achevée; sur ce point, il est en désaccord avec BONGIOVANNI qui obtient aux mêmes concentrations une hydrolyse complète des stéroïdes y compris des 3α-sulfates.

PINELLI et FORMENTO préfèrent donc y associer une solvolyse complémentaire afin d'obtenir une hydrolyse totale. Ils obtiennent ainsi un rendement total de 91 à 96 %.

Dans l'expérimentation considérée on emploie une hydrolyse par le suc d'Helix Pomatia, associant une β-glucuronidase et une sulfatase. L'hydrolyse s'effectue à Ph 7,2 à 37° pendant au moins 24 heures avec du tampon acétoacétique. Préalablement l'urine a été traitée par l'acétate de baryum et la soude 2 N.

On pourrait donc discuter une hydrolyse incomplète des 3α-sulfates stéroïdiens - mais, en fait, celle-ci paraît peu vraisemblable au vu des résultats et le procédé, qui est employé régulièrement par LUUKAINEN a l'énorme avantage d'une simplicité relative tout en n'exigeant qu'un délai de 24 heures. La précipitation préalable par l'acétate de baryum permettrait d'éliminer la plupart des inhibiteurs des sulfatases et augmentent le rendement de l'hydrolyse qui atteint 85 %, ce qui a été vérifié expérimentalement. Cette précipitation proposée par DODGSON et SPENCER en 53 a donc précédé systématiquement toutes nos hydrolyses enzymatiques.
(Addition à l'échantillon urinaire de 10 % en volume d'une solution à 25 % d'acétate de baryum, puis le Ph est ajouté à 11,5, avec de la soude 2 N, le mélange étant laissé 15 minutes à 37°. Puis centrifugation (10' à 3 000 tours) pour éliminer le précipité obtenu ; le surnageant voit son Ph ramené à 5,30).

FORMATION DE DERIVES STABLES EN CHROMATOGRAPHIE

Les stéroides libres ne peuvent pas toujours être soumis tels quels à la chromatographie gaz-liquide : en effet une première tentative d'étude en 1960 d'un groupe de stéroides en chromatographie par VAN DEN HEUVEL et HORNING sur une phase SE_{30} a révélé que les stéroides présentant une chaîne latérale en C_{17} voyaient cette chaîne rompue sous l'effet de la température. On est donc obligé de surmonter cette difficulté, et, ce , par deux ordres de méthodes.

I - Des procédés d'oxydation transforment tous les stéroides, soit en 17- oxo stéroides ou en acides 17 α hydroxy 17 β - carboxyliques non volatils transformés en esters méthyls volatiles par le diazométhane.

II - Des procédés utilisant la formation de dérivés stéroidiens, dérivés qui doivent répondre à un certain nombre de conditions :

- leur formation doit être rapide et complète,
- ils doivent être stables chimiquement à la lumière, à l'humidité et par là même permettre une chromatographie gaz-liquide ; certains de ces dérivés peuvent, en outre, augmenter la volatilité des stéroides et améliorer la séparation et la réponse des stéroides.

I)- Les premières tentatives d'oxydation remontent à 1954 par KITTINGER qui oxydait les stéroides par le periodate ; puis BAILEY (4) et SPARAGANA (175) en 64 et 65 ont introduit l'oxydation par le bismuthate de sodium, mais ce sont MEMINI et NORYMBERSKI en 1965 (133) qui ont établi les bases de la méthode d'analyse par oxydation des stéroides urinaires.

Cette méthode utilise d'abord une réduction par le borohydride, qui convertit les cétones en alcools, puis une oxydation des glycols formés par le bismuthate de sodium : on sépare ensuite les produits de réaction en fraction cétonique (K) et non cétonique (A) par le réactif de Girard ; enfin une deuxième oxydation de chacune des fractions par le tertbutylchromate pour obtenir les fractions KK et KA.

permet de transformer les 2 épimères alcools en une même fonction oxo.

Ces fractions correspondent, par séparation en chromatographie en phase gazeuse :

Pour KK à la 5 β -3- 17-dione, dérivant du pregnane triol, ou plus rarement du tétra S en cas de bloc en 11.

à la 5 β -3-11-17 trione, dérivant des dérivés tétrahydrogénés du cortisol et de la cortisone et des cortols et cortolones.

à la 5α -3-11-17 -trione : isomères des précédents, Allotétrahydrocortisol surtout ; en effet la fraction K-cétonique séparée par la réaction de GIRARD ne peut donner que des composés présentant 2 fonctions oxygène voisines, dont un alcool tertiaire.

Pour KA : la 5-β -3-17-dione dérive de l'étiocholanolone

la 5-α-3-17-dione de l'androstérone

la 5-β-3-11-17-trione de la 11-β-hydroxyétiocholanolone

la 5-α-3-11-17-trione de la 11-β-hydroxyandrostérone,

Toutefois il existe dans cette méthode une perte sensible d'information, liée à la disparition de la chaîne latérale attachée en C_{17}. Dans la plupart des cas, les dérivés correspondent bien à ce qui a été écrit ci-dessus, sauf malheureusement dans le cadre des hyperplasies surrénales, où le 21-déoxycortisol peut contribuer pour une large part à la fraction KK, ce qui doit faire écarter cette méthode pour l'étude des blocs de la stéroidogénèse où une information sur la chaîne latérale en C_{17} revêt la plus grande importance.

Depuis 1965, c'est donc cette méthode, plus ou moins modifiée, qui a été utilisée. Certains, comme BAILEY, préfèrent après oxydation par le bismuthate former des dérivés silylés et fractionner avant la 2° oxydation.

BEALE, CROFT et TAYLOR (8) ont décrit une méthode utilisant après formylation une oxydation par le bismuthate réalisant les fractions GFo et GBFo, puis ces 2 fractions

subissant une 2° oxydation obtenue par le dichromate, donnant GFoCr et GBFoCr.

Chacune des fractions correspond à des stéroides précis.

Enfin NORYMBERSKI a amélioré en 1971 (146) sa propre méthode en découvrant une transformation spécifique des chaînes latérales du type dihydroxyacétone en 17 oxostéroides : il s'agit d'un traitement par le périodate qui transforme les stéroides à chaîne latérale dihydroxyacétone en acide hydroxyaetianique. Celui-ci est alors traité par le bismuthate de Na, qui le transforme en 17-oxostéroide, mais en 17-oxostéroide neutre, ce qui permet une séparation des produits présentant à l'origine cette chaîne latérale spécifique.

De plus le traitement par le périodate et l'acétate de sodium clive les glucuronides, supprimant la nécessité d'une analyse préalable ; on sépare ensuite 6 fractions dérivant de ces dihydroxyacétones glycuroconjugués : l'androstérone, l'étiocholanolone, leurs dérivés 11-β-hydroxy et 11-oxo .

II) La formation de dérivés stéroidiens

A- Dérivés sur les groupes hydroxyles :

Les premiers introduits ont été les éthers triméthilsilyl par LUUKAINEN et HORNING en 1961 (123), obtenus par la méthode de MAKUTA et WELLS grâce à un réactif d'hexaméthyldisilazane dans un solvant pyridine, et accérés grâce à une catalyse par le triméthylchlorosilane. Mais il ne semble pas que cette formation de dérivés silylés permette de stabiliser la chaîne latérale dihydroxyacétone, malgré toutes les améliorations qu'elle apporte par ailleurs : meilleure réponse en chromatographie du fait d'une polarité semblable aux hydrocarbures et d'une amélioration de la volatilité sur les colonnes polaires de la séparation, à la fois par diminution de l'absorption sur la colonne et par augmentation du poids moléculaire du dérivé par rapport au stéroide simple.

De nombreux autres dérivés ont été utilisés : la formation de dérivés bisméthylène dioxy par KIRSCHNER et FALES

en 1962 (112), par réaction avec la formaldéhyde en présence d'acide : mais la réaction se fait en 48 heures à 52° et est donc difficilement réalisable en pratique tout en ne produisant pas toujours un seul et unique dérivé pour chaque stéroide.

En 1965, BROOKS (20) a proposé une acétylation qui induit une bonne stabilité thermique et chimique. Acétylation réalisée en 21 par l'anhydride acétique en solution dans la pyridine et en 17-α et en 11-β par anhydride acétique contenant de l'acide toluène sulfonique sous vide. On distingue 2 groupes de stéroides : le premier, produit avec un bon rendement et ayant une conduite simple en chromatographie peut être utilisé pour des mesures quantitatives : il s'agit des 17α-acétoxy-20-cétones et des 21-acétoxy-20-cétones, à cycle A saturé.

Le second dont le rendement est bon, mais pas quantitatif comprend en particulier les 21-acétoxy-20-cétones avec Δ 4 3-cétone et les 17-21-diacétoxy-20-cétones.

KLIMAN a employé avec succès cette méthode pour la mesure de l'aldostérone.

En 1966 HARA (88) décrit un procédé, où, en associant à la formation d'éther triméthilsilil la formation d'O méthyloximes sur les groupes fonctionnels oxo on obtient dans les conditions de la chromatographie gaz-liquide, une stabilité de la chaîne latérale dihydroxyacétone. La même année, GARDINER et HORNING (69) identifient, grâce à une séparation par programmation de température la plupart des stéroides après formation de dérivés Ométhyloxine triméthylsilyl. A cette occasion ils font remarquer que la méthode ne permet pas de séparation entre l'allotétrahydrocortisol et les cortols, et définissent la notion empirique, sans base théorique, de coefficient de réponse pour les mesures quantitatives, dépendant de la structure du stéroide. Ce coefficient de réponse est déterminé à partir d'un standard introduit dans le mélange d'analyse.

Dans les années qui suivent, plusieurs articles traitent du problème des réactifs de silylation ; on introduit successivement le Bistriméthylsilylacetamide (BTMSA) (93) qui permet de passer de solvant, le produit jouant les 2 rôles de

solvant et de réactif ; puis le N-Triméthylsilyl imidazole (TSIM) (29), puis le diméthyldiacetoxysilane (108) qui forme des siliconides analogues aux acétonides et non des éthers triméthylsilyl.

C'est en 1969 que, dans un article (30), CHAMBAZ et HORNING font le point sur les réactifs de silylation, distinguent 3 sortes de réactions :

- Des réactions non catalysées, où par ordre de réactivité croissante ils classent le triméthylsilyldiméthylamine, puis l'hexaméthyldisilazane, puis le bistriméthylsilylacétamide, puis le plus puissant, le bistriméthylsilyltrifluoroacétamide, seul à réaliser une réaction lente à température ambiante avec la fonction alcool 11 β , la plus inhibée stériquement.

- Des réactions catalysées, entraînant un changement majeur dans la vitesse de réaction, et permettant une réaction avec les fonctions alcool soumises à l'inhibition stérique. Le catalyseur habituellement utilisé est le triméthylchlorosilane, mais l'eau et l'acide ont également un pouvoir catalyseur d'origine inconnue.

La température accroît également la vitesse de réaction et peut même permettre une réaction avec la fonction alcool tertiaire en 17 α . Les meilleures conditions pour silyler l'alcool 11 β sont l'association Bistriméthylsilylacétamide ou bistriméthylsilyltrifluroacétamide avec le triméthyldichlorosilane pendant une nuit à température ambiante ou à 60° . (C'est le mélange bistriméthylsilyltrifluoroacétamide - triméthylchlorosilane qui est employé dans notre expérimentation).

- Des réactions catalysées avec N-triméthylsilylimidazole (TSIM). Les fonctions alcool très inhibées stériquement, telles le 17-α-ol tertiaire ne sont pas ou peu transformées en éthers par les réactifs habituels : le mélange bistriméthylsilylacétamide N-triméthylsilylimidazole, triméthylchlorosilane, dans des proportions 2,3,2 à 60° pendant 6 heures réalise un agent de silylation très puissant avec deux donneurs de silyl, capable de former un éther triméthylsilyl avec l'alcool

tertiaire 17-α malgré son inhibition : ainsi le pregnanetriol sera converti en triéthertriméthylsilyl et les cortols en éther pentatriméthylsilyl, au prix, il est vrai, dans ce dernier cas d'une prolongation de la réaction pendant 72 heures ! Mais apparait alors un problème annexe, celui de la formation avec les fonctions oxo d'énoltriméthylsilyl à condition qu'elles soient libres, et ce, avec un rendement atteignant 60 %. On conçoit l'intérêt pour éviter la formation de tels énols, qui risqueraient de modifier les temps de rétention, de travailler dans des conditions ne permettant pas leur formation, par exemple après formation de méthoximes complexant la fonction oxo et empêchant une énolisation ultérieure.

Enfin, en 1972, SAKAAUCHI et HORNING (165), utilisant le même mélange à des températures beaucoup plus élevées (allant jusqu'à 200°) a vu se réduire notablement le temps de silylation, puisque celle-ci aurait pu être réalisée en une heure, même sur un alcool en 20 alpha. La combinaison des réactifs, utile en-dessous de 150° devient inutile au-delà où le N-triméthylsilylimidazole seul suffit à la silylation. Ils soulignent une fois de plus l'intérêt de réaliser préalablement la transformation des fonctions oxo en méthoximes pour éviter la formation d'énols.

Enfin deux autres dérivés ont été proposés : la formation d'acétonides à partir de dérivés isopropylènedioxy (ADLERKREUTZ) et de celle des éthers cycliques d'alkylboronates utilisés en 69 par BROOKS et WATSON qui forment des cycles à partir de 2 fonctions alcools proximales : cette méthode paraît susceptible de larges développements ultérieurs.

Mais la méthode de loin la plus utilisée pour la chromatographie gaz-liquide reste la formation de dérivés éther de triméthylsilyl, souvent associée en raison de problèmes de stabilité de la chaîne latérale dihydroxyacétone, à la formation de dérivés méthoxymes à partir des fonctions oxo.

B- Dérivés sur les groupes cétones ou oxo :

Dans la plupart des cas, les stéroides comportant des fonctions oxo peuvent être soumis directement à la chromatographie gaz-liquide car la fonction oxo n'entraîne

pas d'absorption sur les supports habituels des phases stationnaires. La décomposition est exceptionnelle. Toutefois la formation de dérivés peut influer sur le temps de rétention.

On a donc cherché à former des dérivés des fonctions oxo stéroidiennes. Le premier procédé employé a été celui de VAN DEN HEUVEL et HORNING (185) en 1963, qui les caractérisait en formant des N-Ndiméthylhydrazones en présence de N-Ndiméthylhydrazine : la réaction de condensation se fait plus ou moins rapidement en fonction de la position du groupe oxo, avec nécessité ou non d'un catalyseur.

En 1965, FALES et LUUKAINEN (62) ont mis au point la formation d'Ométhyloxines qui se forment en une nuit en présence d'un excès d'hydrochloride de méthoxyamine dans la pyridine. Un groupe oxo en 11 ne réagit pas, même après une nuit à 100°. Si le solvant pyridine est remplacé par de l'éther seul le groupe oxo en 3 réagit : nous voyons l'ébauche de réactions spécifiques permettant des conclusions structurales.

En chromatographie sur SE_{30} la formation d'ométhyloximes à partir des fonctions oxo influe sur le temps de rétention en l'accroissant d'un nombre défini qui ne varie que peu en fonction de la position de la fonction sur le squelette stéroidien.

Enfin il faut signaler la possibilité de création de 2 isomères O-méthyloximes à partir de la fonction oxo en C_3, qui peuvent être séparés sur une phase sélective bien qu'ils possèdent le même temps de rétention sur une phase non sélective. Ce fait est confirmé plusieurs fois par des articles successifs qui précisent que ce problème d'isomérie concerne les stéroides 3- oxo 5-α H et 3-oxo double liaison en 4, et concerne également les fonctions oxo en 16. Enfin il semble que le temps de réaction pour former les O-méthyloximes varie en fonction de leur position sur le squelette stéroidien, le plus court étant en C_{20}, le plus long en C_{17}. On souligne plusieurs fois également l'intérêt des dérivés Méthyloxime Triméthylsilyl.

DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE DE GAZ-CHROMATOGRAPHIE UTILISEE

Elle s'effectue sur une aliquote de la totalité des urines de 24 heures, recueillies sur antiseptique (2 ml d'acide mercurothiosalicylique) et éventuellement conservés en chambre froide à -20°.

Avant de pratiquer l'hydrolyse enzymatique des conjugués stéroidiens, on précipite préalablement un certain nombre d'inhibiteurs enzymatiques par une solution d'acétate de Baryum à 25 % qu'on ajoute dans la proportion de 10 % à une fraction, habituellement le 20ème, de la diurése de 24 heures. Le mélange est ensuite ajusté à ph 11,5 par de la soude deux fois normale, et laissé 10 minutes à 37°, puis centrifugé 10 minutes à 4 000 tours/mn. On récupère le surnageant qui sera ajusté à ph 5,2. Parallélement le résidu de centrifugation est lavé par 6 ml de tampon acéto-acétique et le produit de ce lavage est à nouveau centrifugé 10 mn à 4 000 tours, le surnageant ainsi obtenu est ajouté au surnageant de la première centrifugation. On controle le ph qui doit toujours être de 5,2 et on ajoute d'une part 1/10 de volume de tampon acétate de sodium et d'autre part 3 000 u/ml de suc d'Hélix Pomatia.

L'hydrolyse enzymatique peut alors avoir lieu, la solution étant laissée pendant au moins 24 heures au bain-marie agitant à 37°.

Puis la manipulation est reprise et l'on procéde à l'extraction des stéroides libérés : on met dans une allonge la solution qui vient de subir l'hydrolyse et un volume égal de benzéne ; l'ensemble est agité une heure puis on laisse reposer avant de soutirer la partie inférieure qui sera reprise par le benzène dans les mêmes conditions. On réunit alors les deux surnageants qui seront lavés à deux reprises par 10 ml de Soude normale puis plusieurs fois à l'eau, jusqu'à obtention d'un ph neutre. Parallélement on aura extrait une troisième fois la solution soutirée lors de la deuxième extraction benzénique par une quantité égale d'éther-éthanol 3/1 pendant 30 minutes. Le surnageant est également lavé à deux reprises par la Soude normale, puis par l'eau jusqu'à neutralité. Pour débarasser les extraits de leur eau on les filtre sur du Sulfate de Sodium anhydre, puis on les met à sec avant de les reprendre par quelques ml d'éthanol absolu ; les trois extraits

étant mélangés. Les deux premières extractions assurent un rendement satisfaisant pour les 17 Oxostéroides ; la troisième a été ajoutée pour permettre une meilleure extraction des 20 Hydroxy 11 Désoxystéroides.

L'étape suivante consiste à silyler les stéroides extraits. On ajoute préalablement un standard interne sous forme de 100 microlitres d'épicoprostanol. Après évaporation à sec, on ajoute à la seringue

20 microlitres de pyridine bidistillée
10 microlitres de triméthylchlorosilane TMCS
70 microlitres de Bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide où BSTFA.

On chauffe ensuite au bain de sable pendant 10 minutes pour permettre à la silylation d'avoir lieu avec un rendement satisfaisant, et l'on peut ensuite injecter dans la colonne de chromatographie.

Cette colonne est adaptée à un chromatographe de type Packard Becker série 409 muni d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne est en verre, en W et mesure 3,60 m pour 3 mm de diamètre intérieur ; elle est remplie de support de réticulation 100-120, imprégné à 1 % en poids de la phase stationnaire choisie : OV I ou OV 17 selon la méthode décrite par HORNING et collaborateurs (93). Elle est utilisée sous programmation de température à raison d'1,2°/mn de 180 à 240° avec un débit d'azote à 30 ml/mn.

Au prix d'une méthode simple, sans purification chromatographique préalable à l'injection sur la colonne, relativement rapide (3 jours), fiable (les différentes mesures effectuées en série ont montré une bonne répétabilité) d'un rendement satisfaisant (comparable à celui obtenu grace àdes procédés plus complexes), on obtient donc de précieux renseignements sur la nature des 17 Oxostéroides excrétés ainsi que sur les principaux 20 hydroxy 21 déoxystéroides.

Une étude couplée par spectrographie de masse a permis de controler la nature des pics stéroidiens, confirmant les conclusions tirées de l'étude des temps de rétention des solutions standards.

REVUE DE HUIT OBSERVATIONS D'HYPERPLASIE SURRENALE CONGENITALE

Maintenant que sont précisés, d'une part les aspects habituels que revêt l'hyperplasie surrénale congénitale, et d'autre part le principe et les difficultés pratiques d'application de la chromatographie gaz-liquide à l'analyse stéroidienne, nous pouvons aborder l'étude des huit cas survenus ces dernières années dans la région dijonnaise et qui nous ont été confiés par le Professeur NIVELON pour les quatre nourissons et par le Professeur PUTELAT pour les quatre adolescentes et femmes adultes. Ils correspondent tous à la forme la plus fréquente de l'hyperplasie surrénale congénitale, liée à un déficit en 21 hydroxylase ; les quatre cas des nourissons s'accompagnent tous de perte de sel.

OBSERVATION N° 1 -

Résumé :

L'enfant B.. a présenté à partir du 13ème jour un tableau de vomissements, compliqués de déshydratation, évocateur d'une perte de sel confirmée biologiquement. Il s'y associait une discrète macrogénitosomie et une hyperpigmentation des organes génitaux externes. La biologie affirme le bloc enzymatique en 21 ; l'évolution est favorable sous opothérapie, avec une croissance légèrement ralentie.

Valéry B..., né le 29.12.71, est le premier enfant de parents jeunes en bonne santé, sans consanguinité connue. L'accouchement s'est déroulé normalement, après une grossesse sans problèmes. Le poids de naissance était de 3 kg 860, la taille de 51 cm, le coefficient d'APGAR à 9/10. L'enfant va bien jusqu'à son 13ème jour, le 11.1.72, où il se met à présenter des vomissements de plus en plus intenses et fréquents qui vont conduire à l'hospitalisation le 14.1., 3 jours plus tard. On constate alors une importante chute de poids par rapport au poids de naissance atteignant 500 g. L'enfant est cyanosé, en collapsus cardiovasculaire (pression artérielle à 4) manifestement déshydraté. L'examen relève également un certain degré de macrogénitosomie et surtout une hyperpigmentation des plis et des organes génitaux externes. L'ionogramme sanguin fait en urgence révéle la perte de sel avec une natrémie ne dépassant pas 126 Milliéquivalents (Meq), une chlorémie à 86 Meq, la déshydratation responsable d'une hyperazotémie à 1,26 g, enfin découvre une hyperkaliémie majeure à 9,8 Meq. Devant l'urgence du tableau clinique on institue une perfusion intraveineuse apportant du sel et l'on injecte de l'hydrocortisone et du Syncortyl, faussant du même coup les résultats du premier bilan stéroidien, réalisé sur les urines des premières 24 heures d'hospitalisation : on note toutefois déjà une élévation du pregnanetriol 20α à 2,70 mg par 24 heures et de la pregnanetriolone à 2,04 mg. Mais ce traitement amène une amélioration spectaculaire de l'état

clinique. Le bilan stéroidien sera refait quelques jours plus tard après suspension pendant quatre jours du traitement hormonal, mais maintien de l'apport sodé, à l'âge de 4 semaines : les 17 Oxostéroides sont alors très élevés à 2,45 mg/24 h, le pregnanetriol est à 3 mg, la pregnanetriolone à 1,15 mg/24 h.

Dès lors le diagnostic d'hyperplasie surrénale congénitale par déficit en 21 hydroxylase est posé et l'on institue le traitement substitutif qui comprenait initialement 2 g de sel et 10 mg d'Hydrocortisone quotidiens et Syncortyl 2 mg tous les 2 jours. Le Syncortyl sera remplacé quelques jours plus tard par le FLORINEF 1/4 de comprimé par jour, soit 0,025 mg. Ce traitement permet une excellente évolution des résultats biologiques qui se normalisent, les 17 Oxostéroides retombant à 0,85 mg, le pregnanetriol à 0,60 quotidiens. Cliniquement, et malgré un épisode infectieux respiratoire trainant à type de bronchopneumopathie aigüe dyspnéisante survenu en février 72, la croissance staturopondérale reprend, restant toutefois discrétement inférieure à la moyenne; la pigmentation disparait au niveau des organes génitaux externes, la maturation osseuse est un peu lente, le point du grand os n'apparaissant qu'à 9 mois. Au dernier examen de l'enfant à 9 mois, il mesurait 68 cm et pesait 8,15 kg, soit entre moins une et deux déviations standard de la croissance normale selon les normes de SEMPE (168) ; la maturation osseuse atteignait une unité OXFORD selon les normes d'ACHESON (1). L'enfant, à la suite du déménagement de ses parents à LYON, a été confié par le Professeur NIVELON au Professeur JEUNE.

OBSERVATION N° 2 -

Résumé :

L'enfant BOU..., pose le problème de l'apparation au IIème jour, chez un garçon présentant une hyperpigmentation des organes génitaux externes, de troubles digestifs avec déshydratation. Les éliminations stéroidiennes urinaires confirment qu'il s'agit bien d'une hyperplasie surrénale congénitale par bloc de la 21 hydroxylation. Il s'y associe une autre anomalie : mégauretère gauche sur rein unique. Sous traitement substitutif l'évolution est favorable, avec toutefois une croissance légèrement inférieure aux normes.

L'enfant BOU.. Cedric est adressé le 14.2.72 par la Maternité en Pédiatrie, car il présente au 11ème jour des troubles digestifs avec hyponatrèmie et déshydratation chez un garçon hyperpigmenté. Cet enfant est le deuxième de deux parents en bonne santé non consanguins (1 père de 29 ans, une mère de 28 ans, un peu hyperandrogénique). Cet enfant a été longuement attendu (le premier frère en bonne santé actuellement est né en 1959) et on avait parlé de stérilité secondaire mais une hystérographie demandée pour cette raison était revenue normale, et un simple traitement de deux mois par les oestroprogestatifs a été suivi par la conception. La grossesse elle-même a été marquée par une protéinurie transitoire lors des derniers mois, avec des chiffres tensionnels normaux, et surtout une prise de poids exagérée de 13 kg. L'accouchement s'est déroulé normalement.

Ce qui frappe au 11ème jour lors de son hospitalisation, c'est son hyperpigmentation intéressant les bourses, les mamelons, la région périanale. La verge est un peu hypertrophiée, les testicules normaux sont en place. La déshydratation malgré une chute de poids de 500 g par rapport au poids de naissance reste modérée grace à la réanimation, avec une ébauche de pli cutané. L'ionogramme n'est pas évocateur d'une perte de sel : il existe même une hypernatrémie, mais pas d'acidose, une hémoconcentration en partie responsable de l'azotémie

élevée (mais l'enfant avait été perfusé avant l'hospitalisation). Le diagnostic d'hyperplasie surrénale, évoqué de principe, fait pratiquer un dosage des 17 oxostércides urinaires, qui reviendront élevés mais assez modérément à 1,8 Mg/24 h (nouveau-né normal = 1 Mg). Le pregnanetriol lui est très élevé à 1,10 Mg/24 h (nouveau-né normal = 0,1 Mg).

Au 16ème jour, alors qu'aucun traitement n'a été institué, et sous l'influence de vomissements la déshydratation s'affirme, malgré les perfusions de sérum glucosé et salé, avec apparition d'un pli cutané et d'une hypotension, et sur le plan biologique d'une hyponatrémie et hypochlorémie sans hyperkaliémie ni acidose. L'ensemble de ces manifestations est corrigé en 3 jours par une charge sodée (3 g/jour).

Ce n'est que le 24 février, au vu des résultats d'un deuxième dosage, devant des 17 Oxostéroides encore plus nettement augmentés à 3,10Mg/24 h, qu'on institue le traitement freinateur par 7,5 Mg d'Hydrocortisone et 2 Mg de DOC tous les 2 jours en intramusculaire, bientôt remplacés (2 Mars) par 1/4 de comprimé de FLORINEF soit 0,025 Mg/jour. 12 jours après l'institution du traitement, le poids est remonté de 300 g, la tension artérielle est stable, les ionogrammes sanguins et urinaires se sont normalisés, les 17 Oxostéroides sont tombés à 0,50 Mg/24 h. Cette réaction au traitement permet d'affirmer l'hyperplasie congénitale de la surrénale par bloc enzymatique de la 21 hydroxylase. Depuis le traitement substitutif est poursuivi en permanence, plusieurs fois accru en raison d'un freinage insuffisant des 17 Oxostéroides à 1,5 Mg/24 h ; il atteint 12,5 Mg d'hydrocortisone en Mars 1972. Un problème de régurgitations liées à une béance du cardia est traité en Avril par l'alimentation en position assise et l'association de PRIMPERAN et PHOSPHALUGEL. La croissance de l'enfant se poursuit dans un canal compris entre moins une et moins deux déviations standards selon les normes de SEMPE (168) jusqu'au 19.6.72 où l'aspect cushingoïde de l'enfant (dont le poids de 6,600 kg a rejoint les normes habituelles de l'âge, alors que la taille de 58,5 cm reste voisine de moins deux déviations

standards) fait réduire le traitement substitutif à 10 Mg d'Hydrocortisone, puis à 7,5 Mg le 30.6. Un dosage de contrôle des 17 Oxostéroides en Août confirmera le bon freinage malgré la réduction des doses avec un taux de 0,90 Mg/24 h. Le 4.9.72, à l'âge de 7 mois, l'enfant mesure 64,5 cm (normale 68 ± 2,3) et pèse 7,660 kg (normale 8,08 ± 0,83) soit - 1,5 déviation standard pour la taille, et dans les normes pour le poids. L'âge osseux est alors à 0 unités OXFORD, (< à 3 mois) très en retard sur les normes.

Mais l'enfant doit être réhospitalisé à l'âge de 9 mois en Octobre alors qu'il atteint une taille de 66,5 cm pour une perte de poids, une hyperthermie et quelques vomissements. L'examen montre alors un pli cutané, alors que l'ionogramme urinaire ne montre pas de diabéte sodé et qu'il n'y a pas d'hyperkaliémie. La fièvre semble liée à une infection urinaire, et on a la surprise à l'urographie systématique de découvrir une autre anomalie associée à l'hyperplasie surrénale : en effet il existe un mégauretére gauche sur rein unique. L'enfant est alors confié au Professeur MOLLARD, qui après un bilan des fonctions rénales qui sont modérément altérées (clearance à la créatinine à 51 ml/mn, Addis normal, pas de protéinurie, épreuves de concentration légèrement perturbées) intervient le 22.12.72 en réalisant une plastie et une réimplantation de ce mégauretère. Les suites sont compliquées par une fistule vésicale, qui se fermera spontanément, et par des infections urinaires récidivantes, mais finalement bien contrôlées par le traitement après trois mois d'évolution. La croissance se poursuit émaillée d'épisodes infectieux divers. Ainsi à 13 mois le 26.2.73 l'enfant pèse 9 kg (normalement à cet âge 10,8 kg ± 1,09) et mesure 70,8 cm (normalement 75,4 ± 2,4) l'âge osseux étant évalué à une unité OXFORD ce qui correspond à un retard osseux très important ; la taille étant à moins 1,9 déviation standard, le poids à moins 1 déviation standard par comparaison aux normes de SEMPE. Le 22.10.73 à l'âge de 20 1/2 mois l'enfant pése 10,200 kg, soit moins 1,08 déviation standard, et mesure 78,5 cm, soit 1,35 déviation standard en dessous des normes de SEMPE ; l'âge osseux est alors toujours très en retard, évalué à 2 unités OXFORD.

OBSERVATION N° 3 -

Résumé :

Chez l'enfant NAR... l'on voit apparaitre dès le 6ème jour des vomissements, bientôt compliqués de déshydratation. C'est un garçon présentant des organes génitaux externes hyperpigmentés. La biologie, après avoir diagnostiqué une perte de sel, permet d'affirmer l'hyperplasie surrénale congénitale par bloc de la 21 hydroxylation. L'évolution sous opothérapie est favorable, avec toutefois une croissance ralentie surtout en taille.

L'enfant NAR.. Olivier est adressé à l'hôpital de DIJON à l'âge de 8 jours le 1.9.72 par le Dr BRUHNES pour le problème de vomissements apparus au 6ème jour et résistants à un traitement symptomatique par le PIPTAL. Une sténose du pylore a pu déjà être éliminée par les radiographies digestives qui sont normales. La perte de poids atteindrait 420 g depuis la naissance.

Cet enfant né le 25.8.72 à Montbard, après une grossesse et un accouchement normaux, est le deuxième enfant de parents sans antécédents pathologiques (père de 37 ans mère de 30 ans). Son frère actuellement en bonne santé est né le 15.3.67. A son entrée à l'âge de 8 jours, l'enfant qui pése 2,900 kg pour une taille de 48 cm est très tonique et éveillé. La peau est séche mais ne garde pas le pli, le facies est érythrosique ; la langue séche, la tension artérielle basse; enfin les organes génitaux externes sont hyperpigmentés. On évoque d'emblée la possibilité d'une hyperplasie surrénale congénitale, et l'on adresse des urines de 24 h au laboratoire du Professeur PADIEU. Malgré les perfusions et les tentatives de réalimentation, les vomissements persistent, peu influencés par le traitement antispasmodique et l'on constate même une aggravation de la perte de poids. Les ionogrammes répétés montrent en permanence une hyponatrémie atteignant 112 Meq le 3.9 une hypochlorémie à 87 Meq, une hyperkaliémie atteignant 8,1 Meq.

Le 9.9.73 au vu des résultats des 17 Oxostéroides du bilan urinaire initial qui atteignent 5,73 Mg/24 et sont en faveur d'une hyperplasie surrénale congénitale, le traitement est institué, apportant quotidiennement 3 g de chlorure de sodium, 5 Mg d'hydrocortisone, et 2 Mg de Désoxycorticostérone (tous les deux jours à partir du 14.9.). Le 16 septembre l'état de l'enfant est transformé : les vomissements ont cessé, il a repris du poids ; son pli cutané (constaté le 9) a disparu, la diurése et la natriurése se sont réduites, l'ionogramme sanguin est redevenu normal. Après quelques ajustements du traitement (remplacement du SYNCORTYL par du FLORINEF 0,025 Mg/ Jour, augmentation de l'hydrocortisone à 7,5 Mg quotidiens en raison d'un taux de 17 Oxostéroides résiduels élevé à 4,05 et 4,50 Mg/24 h) le malade sort de 22.12 du service à l'âge de 4 mois, avec une taille de 58 cm, soit moins 2,05 déviation standard, et un poids de 4,680 kg, soit moins 2,72 déviation standards selon les normes de SEMPE. A noter au cours de son hospitalisation, la découverte d'une fistule recto-périnéale correspondant à une forme particulière et trompeuse d'imperforation anale, avec fistule située au voisinage du sphincter.

L'enfant est réhospitalisé en Février pour une fièvre persistante après bronchite asthmatiforme, traitée depuis 13 jours en ville par des doses doubles de Cortisone de la RUBITRACINE et du PENISULFA O.R.L. L'aspect de l'enfant cushingoïde, évoque fortement un surdosage thérapeutique, qui est confirmé par l'étude des courbes de croissance staturo-pondérale : le poids continue d'augmenter alors que la courbe de croissance staturale fléchit. Au cours de son hospitalisation qui a duré un mois, l'enfant grandit de 2 centimètres, sans prendre de poids. Il sort le 13.3.73 à l'âge de 7 mois avec une taille de 62 cm (-2,60 déviation standard) et un poids de 6,76 kg, soit moins 1,59 déviation standards selon les normes de SEMPE et PEDRON. L'enfant sera revu le 5.5.73 : il a certes grandi (65 cm) mais la prise de poids est excessive (8,150 kg) et son aspect Cushingoïde fait diminuer le traitement substitutif à 5 Mg d'Hydrocortisone. Depuis la

croissance se poursuit régulièrement, comme en témoigne la taille de l'enfant à sa dernière consultation : à l'âge de 13 mois le 1.10.73 il mesure 70,5 cm soit moins 2,04 déviation standard et pése 9,430 kg soit moins 0,59 déviation standard selon les normes de SEMPE ; enfin son âge osseux est évalué selon les normes d'ACHESON à 4 unités OXFORD (soit entre 10 et 11 mois).

OBSERVATION N° 4 -

Résumé :

L'enfant D.. est vue à sa naissance pour le problème d'une ambiguité sexuelle, réalisant un tableau de pseudo-hermaphrodisme féminin classé comme un type III de PRADER. Au 12ème jour le tableau se complète par des vomissements et une perte de sel : celle-ci est confirmée biologiquement. L'excrétion stéroidienne urinaire est typique d'une hyperplasie surrénale congénitale par défaut de 21 hydroxylation. L'évolution sous traitement substitutif est favorable.

L'enfant D.. Sandrine est vue pour la première fois à sa naissance le 12.9.72, car elle pose le problème d'une ambiguité sexuelle. En effet ce premier enfant d'une mère célibataire de 17 ans, sans antécédents pathologiques, et d'un père de 19 ans qui serait traité pour épilepsie, présente à sa naissance une hypertrophie clitoridienne importante, des grandes lèvres très pigmentées plissées et partiellement soudées, réalisant un sinus urogénital où s'abouchent le vagin et l'urêtre et s'ouvrant par un méat à la base du clitoris. L'ensemble de ces malformations réalise dans la classification de PRADER concernant les pseudo-hermaphrodisme féminin un type III. Cet enfant est né à terme après une grossesse normale où seules ont été signalées des traces de protéinurie ; malgré la présentation en siége décomplété, l'accouchement s'est passé sans incident ; à la naissance le score d'APGAR était à 10.

Devant cette ambiguité sexuelle le diagnostic d'hyperplasie surrénale congénitale a été d'emblée évoqué, mais les premières analyses d'urines réalisées le 18.9.72 à l'âge de 6 jours ne permettaient pas d'affirmer formellement le diagnostic en raison d'un Pregnanetriol peu élevé à 0,17 Mg/24 h alors que la 16 α hydroxypregnenolone et les 17 oxostéroidec sont élevés respectivement à I,85 Mg/24 h et 2 Mg/24 h. L'hésitation persistait donc en dépit du tableau clinique évocateur. Ces résultats, déjà suspects à cet âge, nécessitaient une confirmation par des explorations plus tardives.

Mais au 12ème jour apparaissent des vomissements, un collapsus ; la biologie découvre une perte de sel avec hyponatrémie à 124 Meq se corrigeant mal malgré l'apport sodé ; le potassium est élevé. Un contrôle des excrétions stéroidiennes urinaires est alors pratiqué le 12ème jour et il montre cette fois -ci une augmentation du pregnanetriol à 0,80 Mg/24 h alors que la pregnanetriolone atteint 0,85 Mg/24 h, la 16 α hydroxypregnanolone dépasse 4 Mg/24 h et les 17 Oxostéroides montent à 2,25 Mg/24 h. Le diagnostic est alors affirmé de déficit en 21 Hydroxylase.

Un traitement freinateur est alors institué le 26.9. par 5 Mg d'hydrocortisone par os associé au SYNCORTIL intramusculaire : 2 Mg tous les deux jours. Celui-ci corrige en 48 heures les vomissements pendant que se répare grace à l'apport sodé le déficit sodé. Avant même la connaissance des résultats la réaction au traitement permet d'affirmer le diagnostic.

Le 4.11 on remplace le SYNCORTIL par 1/4 de comprimé quotidien de FLORINEF, soit 0,025 Mg pour réduire l'apport sodé. Le 21.11 un contrôle des stéroides sous traitement les montre normaux. Le freinage satisfaisant est d'ailleurs confirmé par la bonne croissance staturopondérale. Toutefois, on doit augmenter les doses de FLORINEF en raison d'une fuite sodée persistante à 1/2 comprimé par jour. La malade sort avec son traitement substitutif et un apport sodé de 2 g de sel quotidien. Le traitement d'hydrocortisone doit être ajusté à plusieurs reprises, d'abord augmenté à 7,5 Mg en raison de 17 Oxostéroides supérieurs au Mg, puis diminué à 5 Mg en raison de chiffres tensionnels élevés. La croissance se poursuit régulièrement dans les valeurs normales jusqu'au 8.8.73 où l'enfant est réhospitalisé pour hyperthermie à 40° et des vomissements sans signes de localisation. L'augmentation des doses d'hydrocortisone (doubles puis quadruplées) et son administration par voie IV avec une perfusion de sérum salé évite l'apparition d'une insuffisance surrénale aigüe.

Au dernier examen, à l'âge de 9 mois, l'enfant se situe dans un canal de croissance normal, l'écart avec la valeur théorique moyenne de cet âge d'après SEMPE et PEDRON ne dépassent pas un écart-type.

Enfin, l'âge osseux, calculé d'après les normes d'ACHESON, atteint à 8 mois et demi 3 unités (soit entre 6 et 7 mois).

OBSERVATION N° 5 -

Résumé :

L'enfant MAT.. consulte à l'âge de 5 ans pour le tableau d'une pseudo-puberté précoce hétérosexuelle, avec avance staturale et osseuse. Les organes génitaux externes présentent une hypertrophie clitoridienne majeure, mais isolée sans sinus uro-génital. Une des soeurs de la malade présente une hyperplasie surrénale congénitale. Le diagnostic d'hyperplasie surrénale congénitale, évoqué d'emblée, sera confirmé par les éliminations stéroidiennes urinaires. L'évolution est favorable sous traitement freinateur, avec poursuite de la croissance et apparition des premières règles à l'âge de 11 ans.

Mademoiselle MAT.. Bernadette est vue pour la première fois à la consultation du Professeur PUTELAT à l'âge de 5 ans pour une pseudopuberté précoce. On relève dans sa fratrie la présence d'une soeur de trois ans plus âgée porteuse d'un pseudohermaphrodisme féminin par hyperplasie surrénale congénitale, et traitée par Hydrocortisone et Delta Cortisone par le Professeur JEUNE. Ses organes génitaux externes réalisent une masculinisation qui peut être classée comme un type IV de PRADER.

Chez Bernadette, on avait relevé dès la naissance un certain degré d'hypertrophie clitoridienne, mais sans autres manifestations pathologiques : en particulier jamais elle n'a présenté ni diarrhée ni vomissements pouvant faire évoquer un syndrome de perte de sel. Elle a présenté jusqu'à l'âge de 4 ans un développement staturopondéral apparemment normal, mais sa croissance s'est accélérée depuis un an. Lorsqu'elle consulte pour la première fois le 17.5.65, alors qu'elle a exactement quatre ans et 11 mois elle mesure 118 cm à + 5 déviations standards pour 21 kg soit + 3,54 déviations standards des normes de SEMPE et PEDRON, la distance pubis-plante étant de 55 cm, celle du vertex au pubis de 63,5. On constate une pilosité pubienne déjà très fournie, évaluée à P3, un duvet de la lèvre supérieure, une acné de la région dorsale,

mais pas de pilosité axillaire ; les aréoles des seins non développés ont commencé à se pigmenter. Enfin et surtout il existe un organe pénien long de 4,5 cm dont la face ventrale et creusée d'une gouttière ; le méat urétéral est situé à sa base bien distinct de l'orifice vaginal ; il n'existe ni vestibule ni sinus uro-génital. L'ensemble peut être classé comme un type I de PRADER à très gros clitoris. L'évaluation de l'âge osseux radiologique devant cette nette avance staturale, montre un point du pisiforme déjà bien formé, un point olécranien et surtout déjà le point du sésamoide du pouce, correspondant à une âge osseux de 13 à 14 ans.

Au total devant cette avance à la fois staturale (âge correspondant à la taille 7 ans pour 5 ans d'âge réel) et osseuse, cette différenciation masculine des organes génitaux externes à type de pseudo puberté précoce hétéro-sexuelle, la notion d'antécédents familiaux d'hyperplasie surrénale congénitale, le diagnostic de bloc enzymatique congénital est évoqué. Il sera confirmé par le sexe chromatinien positif, l'élévation des 17 Oxostéroides à 28,4 Mg/24 heures, avec des 17 Hydroxycorticoides bas à 1,27 Mg/24 h. L'élévation des androgénes urinaires et surtout du pregnanetriol à 23 Mg/24 h sont en faveur d'un bloc en 21 par déficit enzymatique. Le diagnostic sera confirmé par les résultats du freinage par la Dexaméthasone qui voit s'effondrer l'hyperproduction d'andrrostérone et du pregnanetriol (0,58 Mg).

Depuis cette malade est en freinage continu par la Dexaméthasone (en dehors des périodes d'exploration) et a été opérée à 2 reprises par le Professeur FERRY pour tenter de réduire l'importance de son organe péno-clitoridien. La croissance a pu se poursuivre malgré l'avance de son âge osseux, puisqu'elle atteignait à 12 ans 1,46 m ce qui correspond aux normes pour l'âge, avec un rapport pubis plante/vertex-pubis voisin de 1, avec toutefois l'inconvénient d'une hypertrophie musculaire, d'une hypertrichose de la face au niveau des lèvres, des joues, des favoris. Enfin les premières règles sont

apparues à l'âge de 11 ans.

Au total ce cas réalise un pseudohermaphrodisme féminin du type I de PRADER avec un très gros clitoris, lié à un déficit en 21 Hydroxylase surrénalienne.

OBSERVATION N° 6 -

Résumé :

Mademoiselle ROB.. consulte pour la première fois à l'âge de 14 ans pour une aménorrhée primaire, un arrêt de croissance avec aspect androide, une hyperpilosité. Il existe une hypertrophie clitoridienne nette avec vestibule où s'abouchent séparément urètre et vagin, l'ensemble pouvant être classé comme un type II de PRADER. Le diagnostic d'hyperplasie surrénale congénitale par bloc en 21 sera confirmé biologiquement par les éliminations stéroidiennes urinaires. L'évolution est favorable sous traitement freinateur avec apparition de régles.

L'enfant ROB.. Danièle, consulte à l'âge de 14 ans, fin février 1969, pour aménorrhée, hyperpilosité, arrêt de croissance...

L'étude des antécédents n'apporte rien : parents en bonne santé sans consanguinité, deuxième enfant d'une fratrie de 5 (4 frères) dont aucun n'a jamais présenté la moindre manifestation évocatrice d'hyperplasie surrénale. La grossesse comme l'accouchement ont été normaux. Danièle n'a jamais présenté ni vomissements, ni diarrhée. Elle a présenté vis-à-vis des camarades de son âge une avance staturopondérale, (à 12 ans elle était beaucoup plus forte qu'elles) mais depuis cet âge sa croissance s'est arrêtée ; depuis l'âge de 9 à 10 ans est apparue une hyperpilosité.

Au premier regard on est frappé par son aspect androîde : épaules larges, hanches étroites, cuisses minces, musculature importante avec grosses mains, acné sur le visage, duvet de la lèvre supérieure, voix grave. L'examen clinique va confirmer la virilisation : pilosité pubienne losangique, pilosité interfessière, duvet épigastrique, nombreux poils à la face postérieure des cuisses. Les mamelons sont hyperpigmentés, avec quelques poils au niveau des aréoles, alors que les seins ne sont sont pas développés. Surtout les organes génitaux externes sont très virilisés avec grandes lèvres très pigmentées pseudoscrotales, clitoris très développé de la taille

d'un petit doigt, long de 4,5 cm, présentant une ébauche de prépuce respectant sa face ventrale où débouchent 3 fossettes borgnes puis l'orifice de 4 mm de diamètre, à 2 cm de la base du pénis, d'un vestibule.

La tension artérielle est discrétement élevée à 14/8. La malade est hospitalisée 2 semaines plus tard, et l'examen gynécologique, fait sous anesthésie, confirme la présence d'un sinus uro-génital avec 2 orifices dont le postérieur, rétréci par une petite membrane hyménéale, donne accés à une cavité vaginale et à un utérus, bien mis en évidence par une opacification par la diodone. Une laparoscopie confirme la présence d'organes génitaux internes féminins normaux.

Parallélement sont pratiqués des dosages de stéroides urinaires qui confirment l'hypothèse d'une hyperplasie surrénale congénitale, évoquée sur la clinique : élévation des 17 Oxostéroides à 35,2 Mg/24 heures, pregnanetriol à 44,88 Mg, pregnandiol à 49 Mg. Une chromatographie est alors réalisée d'après la technique de DINGEMANSE : elle montre que parmi les 17 Oxostéroides sont surtout augmentées les vagues IV et V correspondant à l'Androstérone et l'Etiocholanolone et les vagues VI et VII correspondant aux II Oxy 17 Oxostéroides. Une stimulation par l'A.C.T.H. ne modifie que peu ces chiffres, alors qu'un freinage par la Dexaméthasone les effondre : 17 Oxostéroides à 4 Mg/24 h, pregnanetriol à 0,1 Mg/24 h. La malade est donc mise à un traitement continu par le Dectancyl, 0,50 Mg/jour. Une ablation chirurgicale du clitoris avec plastie vulvaire est réalisée le 27 Mars 1969 par le Professeur FERRY.

La malade est suivie depuis lors en consultation. L'on voit ainsi apparaitre une puberté, avec développement mammaire modeste ; l'état pilaire reste inchangé tandis que l'acné régresse. On conclut à un freinage insuffisant et l'on passe le traitement freinateur à 1 Mg/jour de Dexaméthasone. Sous l'effet de ce traitement l'on voit apparaitre des régles tous les 15 jours ; la malade diminue alors spontanément son

Dectancyl. En Septembre 71 le virilisme pilaire n'a pas régressé, mais les seins se développent. Le résultat local de la chirurgie des organes génitaux n'est pas parfaitement satisfaisant, et une seconde intervention plastique sera probablement nécessaire pour permettre des rapports sexuels normaux. A cette époque, les examens biologiques des stéroides urinaires montraient sous traitement par un comprimé quotidien de Dectancyl, soit 0,5 Mg de Dexaméthasone un freinage un peu insuffisant avec une pregnanetriolurie à 8,80 Mg/jour. En raison du résultat clinique satisfaisant, on laisse la malade au même traitement. La malade est revue en septembre 1972 : les régles sont régulières, les seins peu développés, la pilosité persiste inchangée ; le toucher perçoit un rétrécissement vaginal. Depuis la malade n'a pas été revue.

Le recueil des urines pour la chromatographie a pu être fait à l'occasion d'une fenêtre thérapeutique.

En conclusion, il s'agit d'un pseudo hermaphrodisme féminin, réalisant un type intermédiaire entre les type II et III de PRADER, lié à un déficit en 21 hydroxylase.

OBSERVATION N° 7 -

Résumé :

Mademoiselle G.. consulte pour des troubles des régles à type d'oligoménorrhée avec morphotype androïde et hyperpilosité ; il existe une hypertrophie clitoridienne modérée. Deux de ses soeurs présentent également des troubles des régles et une hypertrichose. Le stéroidogramme urinaire confirme le diagnostic d'hyperplasie surrénale congénitale par déficit en 21 Hydroxylase.

Mademoiselle G.. Michèle est vue pour la première fois à l'âge de 15 ans. Elle est adressée au Professeur PUTELAT par le Docteur LEROUGE en raison de troubles des régles à type d'oligoménorrhée.

L'interrogatoire relève dans sa fratrie un certain nombre d'anomalies : en effet parmi ses cinq soeurs l'annamnése découvre dans deux cas des périodes d'aménorrhée secondaire (Denise et Odile) et surtout des cycles allongés durant 40 à 60 jours, avec dysménorrhée, et un certain degré d'hypertrichose (Annie et Odile), mais sans anomalies de la voix ni des organes génitaux externes ; leur frére Claude est également normal, de même que ses parents qui ne sont pas consanguins.

Mademoiselle G.. a été réglée une première fois à l'âge de 13 ans 1/2, et depuis elle est réglée à un rythme de 2 à 4 fois par an.

Ce qui frappe d'emblée à l'examen de cette malade, c'est le morphotype androïde : aspect trapu, 1,57 m pour 51 kg, épaules larges, développement musculaire important ; le diamètre bihuméral à 41 cm est supérieur au bitrochantérien à 31 cm. Les seins sont hypotrophiques. La pilosité est exagérée, intéressant la lèvre supérieure, les aréoles mammaires, la ligne ombilicopubienne, le sillon interfessier, la région périanale, enfin la face postérieure des cuisses et les jambes que la malade doit épiler. La voix est un peu rauque.

L'examen des organes génitaux externes relève une hypertrophie clitoridienne modérée, mais incontestable, de la taille d'un capuchon de stylo à bille, isolée. L'examen gynécologique est normal, ce qui sera confirmé par la coelioscopie montrant un utérus un peu hypoplasique, des ovaires normaux avec plusieurs cicatrices de corps jaunes.

Le diagnostic de bloc enzymatique congénital de l'hormonosynthèse surrénalienne est évoqué d'emblée devant ce tableau clinique de virilisation ; il sera confirmé par les résultats des dosages biologiques. Ceux-ci montrent en effet :

- une augmentation des 17 Oxostéroides à 19,4 mg/24 heures.
- une augmentation du pregnanetriol à 15 mg/24 heures.

Ces deux anomalies se corrigent bien après un freinage par la Dexaméthasone.
Par contre on est assez surpris par le taux élevé des 17 Hydroxycorticoides avant tout traitement freinateur : il atteint malgré le bloc enzymatique 10,6 mg/24 heures.

Cette observation réalise donc un tableau de virilisation d'origine surrénalienne avec pseudo-hermaphrodisme féminin du type I de PRADER.

OBSERVATION N° 8 -

Résumé :

Madame F.. consulte pour la première fois à l'âge de 29 ans en raison d'une stérilité secondaire sans troubles des régles, mais associée à un hirsutisme apparu à l'âge de 17 ans et à une hypertrophie clitoridienne modérée. Le diagnostic d'hyperplasie surrénale congénitale par bloc de la 21 hydroxylation a été confirmé par l'étude des excrétions stéroidiennes urinaires.

Madame F.. consulte pour la première fois en 1971, à 29 ans, adressée par le Docteur WEBER de Lons-le-Saunier pour une stérilité secondaire, L'étude des antécédents familiaux n'apporte rien, sinon la notion assez vague d'une grand-mère paternelle présentant une hyperpilosité. Celle des antécédents personnels permet de retenir un hirsutisme qui serait apparu à 17 ans, sans qu'on puisse retenir la moindre notion d'avance staturale ou de troubles de la puberté qui s'est faite normalement à 13 ans. Depuis elle est réglée régulièrement pendant 3 jours tous les 21 jours. Elle s'est mariée à 21 ans et a été enceinte à 23 ans, la grossesse étant troublée par une menace d'avortement, cédant sous antispasmodiques, et par une élévation tensionelle. L'accouchement a eu lieu par césarienne. L'enfant, une fille a grandi normalement, est actuellement en bonne santé et n'a jamais présenté la moindre anomalie endocrinienne.

La malade consulte donc pour une stérilité secondaire, qu'un traitement par Lutogyl et Synergon à l'âge de 26 ans n'a pas amélioré ; simultanément l'hypertrichose s'est aggravée. Elle a toujours été bien réglée et l'étude de la courbe thermique a permis de constater sur 3 mois les décalages thermiques témoins de l'ovulation. Une biopsie d'endométre pratiquée pendant la deuxième partie du cycle a confirmé la présence d'une imprégnation progestative de la muqueuse. Enfin l'hystérographie est normale. Dernier élément du dossier, un

dosage des 17 Oxostéroides réalisé à 29 ans, et qui montrait leur augmentation à 27 mg/24 h, chiffre bien réduit par le Dectancyl à 4,20 mg.

Ce qui frappe d'emblée à l'examen de cette malade, c'est une obésité diffuse (86,5 kg pour 1,61 m) sans amyotrophie , ni vergetures pourpres. La pilosité est assez importante, sourcils épais, poils au niveau de la lèvre supérieure du menton des maxillaires. Sur le tronc on note une touffe médiothoracique, des poils périaréolaires, une pilosité pubienne losangique remontant jusqu'à l'ombilic : enfin les fesses, le sillon interfessier et la face postérieure des cuisses sont couvertes de poils. L'examen des organes génitaux retrouve une hypertrophie clitoridienne, encapuchonnée avec un frein, de la taille d'un capuchon de stylo et mesurant environ 1 cm. Le reste de l'examen n'apporte pas d'autres éléments sinon un faciés érythrosique ; les chiffres tensionnels sont normaux (13/8).

L'ensemble du tableau clinique évoque une hyperandrogénie d'origine endocrinienne surtout en raison de l'hypertrophie clitoridienne. Les examens paracliniques vont le confirmer : coelioscopie normale, 17 Oxostéroides à 31,30 mg/24 h et pregnanetriol à 16,30 mg/24 h, bien réduits par le Dectancyl (1 comprimé par jour) à respectivement 2,10 mg/24 h et 0,75 mg/24 h. Dès lors le diagnostic d'hyperplasie surrénale congénitale par déficit en 21 hydroxylase peut être affirmé ; l'épreuve associant Gonodotrophines et Dectancyl le confirmera en n'entrainant aucune augmentation des chiffres des 17 Oxostéroides et du pregnanetriol urinaires par rapport au Dectancyl seul.

Ce cas réalise donc dans la classification de PRADER une forme mineure du type I avec simple hypertrophie clitoridienne isolée.

L'étude des résultats des excrétions stéroidiennes urinaires des 8 cas étudiés, que nous avons transcrit dans un tableau, révèle avec toutes les réserves qu'impose l'étude d'un nombre aussi restreint d'observations :

a) Une augmentation constante des 17 Oxostéroides :

Elle est plus marquée dans les 2 cas de révélation prépubertaire (n° 5 et 6) où elle atteint en moyenne 23,45 mg (normalement 1 à 2mg) que dans les deux cas post-pubertaires : 31,2 mg pour une normale à 10 mg. Elle se retrouve chez les nourrissons qui excrétent 3,8 mg en moyenne pour un taux normal à 0,43 mg/ 24 H.

b) les 17 Hydroxystéroides dosés par la méthode de PORTER et SILBER montrent que pour la moitié des nourrissons, avant tout traitement, les excrétions par 24 h sont normales.

c) La chromatographie en phase gazeuse permet l'étude individuelle de chacun des 17 Oxostéroides :

- l'androstérone (3α-hydroxy-5α-androstan-17-one) est très variable dans ses taux, mais toujours supérieure aux valeurs normales ; elle est dans tous les cas sauf un (le n° 6) supérieure à :

- l'étiocholanolone (3α-hydroxy-5β-androstan-17-one), elle aussi variable : discrétement élevée chez le nourrisson (moyenne 0,047 mg pour une normale à 0,035) elle l'est beaucoup plus dans les formes révèlées après la puberté (5,62 contre 1,3 mg), les 2 cas prépubères atteignant en moyenne 2,45 ce qui est déjà un taux supérieur à celui d'une femme adulte normale.

- la déhydroépiandrostérone (3β-hydroxy-5-androsten-17-one) : il semble que son élévation soit plus marquée chez les 2 cas révélés après la puberté (4,12 mg contre une normale à 0,8 mg). Elle n'a pas été mesurée chez le nourrisson où c'est son équivament, la 16α Hydroxy-Déhydroépiandrostérone (3β, 16α-dihydroxy-5-androsten-17-one) qui a été mesurée : elle s'élève à 2,38 mg chez les nourrissons atteints contre 0,67 mg en moyenne chez des nourrissons normaux. Son isomère la 16β HydroxyDéhydroépiandrostérone (3β, 16β-dihydroxy-5-

androsten-17-one) atteint 1,05 mg au lieu des 0,15 mg du nourrisson normal.

- La 11-oxo androstérone (3α-hydroxy-5α-androstan-11, 17-dione) : les taux s'élévent avec l'âge des malades ; toutefois les deux cas révélés après la puberté auraient un taux plus élevé. Dans l'ensemble son taux est plus élevé que celui de

- La 11-oxo étiocholanolone (3α-hydroxy-5β-androstan-11, 17-dione), accrue par rapport aux taux normaux, tant chez le nourrisson que l'adolescent, mais très variable.

- La 11-β-hydroxy androstérone (3α, 11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one) elle apparait, et de loin, comme le métabolite le plus important des 17 Oxostéroides. Elle serait proportionnellement plus élevée dans les cas de révélations prépubertaire de l'adolescent. Elle est toujours nettement supérieure à

- la 11-β-hydroxy étiocholanolone (3α, 11β-dihydroxy-5β-androstan-17-one) qui apparait proportionnellement plus élevée chez le nourrisson (7 fois les taux normaux) où elle n'a été il est vrai mesurée que 2 fois, et dans les formes à révélation prépubertaire de l'adolescent.

Si l'on calcule l'index de 11 Oxygénation à partir de ces résultats, l'on constate que, s'il est très élevé chez les enfants et les adolescents pré et post-pubères, il est par contre voisin de la normale chez le nourrisson, du fait de l'importance des dérivés 16 Hydroxylés de la déhydroépiandrostérone.

Si l'on calcule à partir de ces résultats le rapport des dérivés 5α de la série androstane à ceux de la série 5β étiocholane, l'on constate qu'il est toujours supérieur à l'unité, confirmant la prédominance des métabolites de la série 5α ; sans que l'âge de révélation de la maladie semble influer beaucoup : de 1,96 en moyenne chez le nourrisson, il passe à 1,95 dans les 2 cas de révélation post-pubertaire. Cette donnée ne concorde pas avec celle de la littérature, nous y reviendrons.

Enfin, si l'on considère le rapport des dérivés 11 Hydroxy 17 Oxostéroides aux dérivés 11 Oxo 17 Oxostéroides, il s'avère nettement plus élevé chez les adolescentes présentant une révélation prépubertaire de la maladie : il atteint 5 contre 1,59 aux révélations postpubertaires et 2,77 chez le nourrisson.

d) Si l'on examine maintenant les 20 hydroxy 21 déoxystéroides, l'on constate :

- Une élévation majeure du pregnanetriol 20 α (5 β-pregnane-3α,17α, 20 α-triol) mais encore plus marquée dans les deux cas de révélation prépubertaire de l'adolescent (47,8 mg en moyenne) (contre 19,1mg pour les révélations post-pubertaires), normalement il ne dépasse pas 1 mg.

- Le pregnandiol (5 β-pregnane-3 α, 20 α-diol) apparait également élevé, en particulier dans les 2 cas de l'adolescent prépubère, où l'interférence du cycle menstruel apparait exclue.

* - La pregnanetriolone, (3α,17α, 20α-trihydroxy-5β-pregnane-11-one), qui normalement n'est rencontrée qu'à l'état de traces et qui pour certains auteurs serait aussi spécifique du bloc en 21 que le pregnanetriol, est très élevée tant chez le nourrisson où elle atteint en moyenne 0,78 mg que chez l'adolescent et l'adulte ; elle serait particulièrement élevée dans les formes de révélation prépubertaire de l'enfant

- La 17α Hydroxy pregnanolone (3α, 17α-dihydroxy-5β-pregnane-20-one) apparait très élevée chez les nourrissons avec une moyenne à 1,15 mg/24 h et un résultat extrême à 2,7 mg pour une normale à 0,025 mg ; elle l'est également chez l'adolescent et l'adulte où elle a été mesurée 2 fois : 32,5 mg dans le cas nº 3 de révélation prépubertaire et 7,2 mg dans le cas nº 8 révélé après la puberté.

e) Enfin il existe pour un certain nombre de métabolites des augmentations qui paraissent particulières aux formes du nourrisson :

- La 16α-hydroxy pregnanolone (3β,16α-dihydroxy-5-pregnen-20-one), qui apparait très augmentée dans l'hyperplasie

* Appelée aussi 11 cétopregnanetriol.

surrénale congénitale du nourrisson, où son excrétion atteint 2,90 mg pour 24 heures alors que la valeur normale est de 0,5 mg.

- l'androsténediol n'a pas été mesuré ; par contre le 16 -Oxo androsténediol (3β,17β -dihydroxy-5-androsten-16-one) apparait élevé à 0,86 mg/24 h chez les nourrissons atteints contre 0,2 mg normalement.

- l'androsténetriol 16α (5-androstene-3β, 16α, 17β-triol) est également élevé chez les nourrissons atteints

- Enfin le pregnenetriol 16α (5-pregnene-3β, 16α, 20α-triol) parait également élevé chez les malades nouveaux-nés.

Au total, on peut distinguer dans les cas que noous avons étudiés, en fonction de leurs résultats, trois groupes distincts :

- les nouveaux-nés, où le catabolisme stéroidien si particulier à cet âge imprime un physionomie originale au stéroidogramme :

. Importance, comme chez le nouveau-né normal, des dérivés 16 Oxygénés et en particulier de la 16α-hydroxy pregnenolone qui dépasse de très loin en valeur absolue le pregnanetriol-20α considéré jusqu'ici comme le métabolite le plus spécifique.

. L'index de 11 Oxygénation est normal dans nos 4 cas ; la littérature (125) signalait déjà l'infidélité de cet index avant le 8ème jour ; en fait il semble que ce délai peut être considéré comme optimiste au vu de nos résultats, et si l'on tient compte des dérivés 16 hydroxylés de la déhydroépiandrostérone.

. Présence de métabolites inhabituels chez les sujets plus âgés, en particulier insaturés : pregnenetriol 16α et 17α .

. Enfin, toujours dans le cadre de l'activité plus importante connue à cet âge à l'enzyme de la 16 hydroxylation, les dérivés 16 hydroxylés de la Déhydroépiandrostérone ont une importance majeure, et sont bien supérieurs à l'androstérone et à l'étiocholanolone.

- les grands enfants prépubères, présentant une forme de révélation semi-précoce ; ils se distinguent par :

surrénale congénitale du nourrisson, où son excrétion atteint 2,90 mg pour 24 heures alors que la valeur normale est de 0,5 mg.

- l'androsténediol n'a pas été mesuré ; par contre le 16 -Oxo androsténediol (3β,17β -dihydroxy-5-androsten-16-one) apparait élevé à 0,86 mg/24 h chez les nourrissons atteints contre 0,2 mg normalement.

- l'androsténetriol 16α (5-androstene-3β, 16α, 17β-triol) est également élevé chez les nourrissons atteints

- Enfin le pregnenetriol 16α (5-pregnene-3β, 16α, 20α-triol) parait également élevé chez les malades nouveaux-nés.

Au total, on peut distinguer dans les cas que noous avons étudiés, en fonction de leurs résultats, trois groupes distincts :

- les nouveaux-nés, où le catabolisme stéroidien si particulier à cet âge imprime un physionomie originale au stéroidogramme :

. Importance, comme chez le nouveau-né normal, des dérivés 16 Oxygénés et en particulier de la 16α-hydroxy pregnenolone qui dépasse de très loin en valeur absolue le pregnanetriol-20α considéré jusqu'ici comme le métabolite le plus spécifique.

. L'index de 11 Oxygénation est normal dans nos 4 cas ; la littérature (125) signalait déjà l'infidélité de cet index avant le 8ème jour ; en fait il semble que ce délai peut être considéré comme optimiste au vu de nos résultats, et si l'on tient compte des dérivés 16 hydroxylés de la déhydroépiandrostérone.

. Présence de métabolites inhabituels chez les sujets plus âgés, en particulier insaturés : pregnenetriol 16α et 17α .

. Enfin, toujours dans le cadre de l'activité plus importante connue à cet âge à l'enzyme de la 16 hydroxylation, les dérivés 16 hydroxylés de la Déhydroépiandrostérone ont une importance majeure, et sont bien supérieurs à l'androstérone et à l'étiocholanolone.

- les grands enfants prépubères, présentant une forme de révélation semi-précoce ; ils se distinguent par :

. L'élévation plus marquée du pregnanetriol 20α
. Parmi les 17 oxostéroides :
une déhydroépiandrostérone basse
un index de 11 Oxygénation élevé
un rapport 11 Hydroxy 17 Oxostéroides / 11 Oxo 17 Oxostéroides plus élevé que dans les formes révélées tardivement, ce qui pourrait être lié au moins partiellement à un accroissement proportionnellement plus important de la 11β Hydroxyétiocholanolone.

- les adolescents et adultes qui présentent une forme de révélation tardive, post-pubère de la maladie :

. un pregnanetriol moins élevé que les formes révéles plus précocement, de même que pregnanetriolone et 17 α hydroxy-pregnanolone.

. un index de 11 Oxygénation relativement plus bas, quoique largement supérieur à la normale, de même que le rapport des 11 Hydroxy / 11 Oxo 17 Oxostéroides. Ces modifications sont vraisemblablement liées aux éliminations stéroidiennes d'origine gonadique.

20 HYDROXY 21 DEOXY STEROIDES mg/24 h.

mg / 24 H.	Pregnan-diol	Pregnane-triol 20∝	17 Hydroxy pregne-nolone	Pregnane triolone	16 Oxoandrosténédiol	Androstrenetriol 16∝	Pregnenetriol 16∝	Pregnenetriol 17∝	16∝Hydroxy pregnenolone
Nourrisson normal 4 à 15 j.			0,025		0,205	0,13	0,035		0,5
Cas n° 1 BUT.V		2,95	2,7	1,15	0,585	0,740	0,400	0,55	2,63
Cas n° 2 BOU.C 12 jours	0,55	1,11	0,84	0,86	1,02	0,580	0,075	0,33	3,88
Cas n° 3 NAR.O 9 jours	0,96	0,710	0,6	0,75	1,52	0,675	0,16	0,40	3,29
Cas n° 4 DEM.S	0,120	0,160	0,28	0,35	0,330	0,21	0,090		1,85
Femme adulte normale	0,6 à 5 mg (suivant cycle)	1 mg		inférieur à 0,01 mg					
Cas n° 5 MAT. prépubère 5 ans	3,06	48,6	32,1	8,3	indosables		ou	traces	
Cas n° 6 ROB. prépubère 14 ans	4,50	47		5 mg	indosables		ou	traces	
Cas n° 7 GUY. postpubère 15 ans	0,37	21,9			indosables		ou	traces	
Cas n° 8 FE. postpubère 25 ans	8,9	16,3	7,20	0,83	indosables		ou	traces	

17 OXOSTEROIDES (mg / 24 h.)

	17 oxo stéroïdes	17 hydroxy corticoïdes	Andro stérone	Etio-cholanolone	Déhydro épiandro stérone DHEA	16 α hydroxy DHEA	16 β hydroxy DHEA	11 oxo-jandro-stérone	11 oxo-étiocholanolone	11 β hydroxy andro stérone	11 β hydroxy-étiocholanolone	Index de 11 oxy-génation	17 oxo / 11 hydroxy / 11 oxo	5 α / 5 β
Nourrisson normal 4 à 15 j.	0,43	0,29	-	0,035		0,67	0,16	-	0,015	-	0,05			
Cas n° 1 BUT. 15 jours	5,70	0,28	0,45	0,08		4,2	1,81	0,15	0,06	0,95	0,65	0,27	7,6	1,9
Cas n° 2 BOU. 12 ours	1,80	0,84	0,07	0,02		2,39	0,52	-	0,34	0,42	-	0,25	1,2	1,3
Cas n° 3 NAR. 9 jours	5,75	< 0,1	0,175	0,06		2,41	1,60	0,26	0,175	0,475		0,22	1,09	3,8
Cas n° 4 DEM. 5 jours	2,00	< 0,1	0,06	0;03		0,515	0,29	0,065	0,03	0,11	0,05	0,28	1,2	2,1
Femme adulte normale	10 ± 5	7 mg	1,5	1,3	0,8				0,4	0,88	0,6	0,32		
Cas n° 5 MAT. prépubère 5 ans	24,40	2,10	4,65	1,10	0,60			1,24	0,90	7,40	2,46	1,88	4,6	2,97
Cas n° 6 ROB. prépubère 14 ans	22,50	4,30	3,60	3,80	1,70			2,05		8,05	3,20	1,47	5,4	1,66
Cas n° 7 GUY. postpubère 15 ans	31,10	4,30	13,50	7,14	4,84			3,90	4,27	5,80	0,98	0,58	0,82	1,86
Cas n° 8 FE. postpubère 29 ans	31,30	1,25	4,25	4,10	3,40			2,45	1,55	8,15	1,30	1,23	2,36	1,86

REVUE DES DONNEES DE LA LITTERATURE

Après cette revue de nos observations et l'analyse de leurs résultats, il importe de les confronter aux données de la littérature consacrée aux hyperplasies surrénales, et tout particulièrement aux essais d'application antérieurs de la chromatographie en phase gazeuse à l'étude des stéroides présents dans les urines de ces malades.

Après que BONGIOVANNI en 1953 ait insisté sur l'élévation du pregnanetriol dans l'hyperplasie surrénale congénitale, dès 1955 EBERLEIN et BONGIOVANNI (54) ont constaté que cette maladie s'accompagnait d'un accroissement des 17 Oxostéroides et plus particulièrement des 11 Oxy 17 Oxostéroides qui atteignent 22 % des 17 Oxostéroides au lieu des 10 % constatés chez le sujet normal. Ils confirment l'accroissement du pregnanetriol 20 α mais constatent également celui de la pregnanetriolone et des stéroides acétaldéhydogénes.

En 1957, FUKUSHIMA et GALLAGHER (66) par des méthodes chimiques et chromatographiques, étudient les 20 Hydroxy 21 déosystéroides dans l'hyperplasie surrénale congénitale : le pregnanetriol 3α 17α 20α est retrouvé augmenté, atteignant dans un cas 65 mg/jour, ainsi que ses isomères allopregnanetriol 20 α et 20 β, que le pregnandiol, le 11 céto-pregnanetriol, le pregnanetétrol 3 α, 11 β, 17 α, 20 α.

La même année, DECOURT, JAYLE et BAULIEU (41) confirment l'augmentation des 17 Oxostéroides et du complexe pregnandiol. Mais surtout, dans un autre article (104), grace à une chromatographie sur papier, les mêmes auteurs précisent la nature des 17 Oxostéroides neutres dans deux cas d'hyperplasie surrénale congénitale : ils montrent ainsi la prédominance des dérivés 5 α du type androstane sur les dérivés 5 β du type étiocholane, peut-être en raison d'une déviation métabolique sous l'influence de la 17 Hydroxyprogestérone. Ils signalent également pour la première fois la prédominance, parmi les dérivés 11 Oxy 17 Oxostéroides, de la 11 β Hydroxyandrostérone.

Toujours en 1957, MASUDA (128) confirme ces constatations par un procédé de séparation sur colonne.

Par contre en 1958 JAYLE, WEINMAN, BAULIEU et VALLIN (105), dans un virilisme de révélation tardive découvert à l'accasion d'une stérilité conjugale, sans hirsutisme ni virilisation marquée, constatent par une chromatographie sur papier une augmentation modérée des 17 Oxostéroides avec prédominance des dérivés 5 β de la série étiocholane, et une augmentation marquée du complexe pregnandiol.

En 1959, BONGIOVANNI et SMITH (13), par une revue de 11 cas d'hyperplasie surrénale congénitale, étudiés par chromatographie sur colonne et colorimétrie, confirment les constatations de FUKUSHIMA et GALLAGHER ; ils insistent sur la prédominance chez les nourrissons de moins d'un an atteints du 11 cétopregnanetriol et sur la présence de 17 Hydroxy-pregnanolone.

En 1960, HILL (90) insiste sur la valeur, déjà reconnue antérieurement, de l'accroissement des 11 Oxy 17 Oxostéroides dans l'hyperplasie surrénale congénitale et propose d'établir le rapport des 17 Oxostéroides non oxygénés en 11 aux 17 Oxostéroides oxygénés. Ce rapport passe de 0,24 chez les sujets normaux à une moyenne de 2,3 chez les porteurs de la maladie.

La même année, BERGSTRAND, BIRKE et PLANTIN (9) étudient la variation des métabolites en fonction de l'âge de l'hyperplasie surrénale. Ils en concluent que si les enfants les plus jeunes éliminent du 11 cétopregnanetriol, les plus âgés éliminent surtout du pregnanetriol.

En 1962, DECOURT et GUINET, dans un ouvrage consacré aux états intersexuels (42) insistent dans le chapitre consacré aux hyperplasies surrénales congénitales sur l'élévation du pregnanetriol urinaire et sur celle du 11 cetopregnanetriol qui serait plus spécifique encore ; parmi les 17 Oxostérides, ce sont les 11 Oxy- 17 Oxostéroides et au premier chef la 11β-hydroxy-androstérone qui prédominent bien que les formules soient très variables.

C'est en 1963 que l'on relève la première application par KIRSCHNER et LIPSETT (113) de la chromatographie gaz-liquide à l'étude des 11 Déoxy 17 Oxostéroides chez un sujet normal.

Dès 1965 (156) REYNOLDS signalait chez le nouveau-né normal, un métabolisme stéroidien différent, lié à la faible activité du système de la 3 β Hydroxy-stéroide oxydo-réductase et à une activité élevée de l'enzyme de 16 α Hydroxylation qui serait situé au niveau du foie. Ceci explique l'importance plusieurs fois constatée depuis, des dérivés 16 α Hydroxy chez le nouveau-né.

En 1965, BERTRAND, ROUX et LORAS (11) ont étudié par chromatographie sur papier les différences dans l'excrétion stéroidienne de malades atteints d'hyperplasie surrénale congénitale en fonction de l'âge. Ces études ont révélé :

Chez le nourrisson, surtout porteur d'une perte de sel, une prédominance parmi les 17 Oxostéroïdes de la 11 β - hydroxy-androstérone (au lieu de la 11 Céto-étiocholanolone des sujets normaux) :

- des dérivés 11 Hydroxy sur les dérivés 11 Céto 17 Oxostéroïdes
- et celle des métabolites du type 5 α (de la série androstane) sur les 5 β (de la série étiocholane).

A l'opposé, l'adolescent montre des anomalies moins importantes de la formule de ces 17 Oxostéroïdes qui se rapproche de la normale malgré une augmentation globale. En effet la prédominance des 11 Hydroxy 17 Oxostéroïdes est moins nette, de même que l'accroissement des 11 Oxy 17 Oxostéroïdes ; le rapport des dérivés 5 α au dérivés 5 β retombe dans les valeurs normales.

La même année, MALMEJAC dans sa thèse (126), en utilisant la méthode de séparation de JAYLE, conclut à l'augmentation de la fraction C qui correspond aux 11 Oxy 17 Oxostéroïdes, et à la diminution de la fraction androstérone + étiocholanolone, alors que dans sa forme de révélation plus tardive, sans malformations, l'on constate que la fraction C est seulement à la limite supérieure de la normale ; androstérone, étiocholanolone et déhydroépiandrostérone sont tous augmentés.

Toujours en 1965, MIGEON et BAULIEU (138), insistent sur l'importance au niveau des urines des 4 20 hydroxy 21 déoxystéroïdes : pregnane 3 α 17 α 20 α Triol, pregnane 3 α 20 α Diol 11 One, pregnane 3 α 20 α Diol, pregnane 3 α 17 α Diol 20 One.

et pour les 17 Oxostéroides de l'étiocholanolone et de l'androstérone pour les 11 Désoxy, de la 11 β hydroxy-androstérone et de la 11 cétoétiocholanolone pour les 11 Oxy 17 Oxostéroides.

Ils signalent également une hyperproduction des Oestrogénes.

C'est l'année suivante, 1966, que KINOSHITA, ISURUGI et TAKAYASU (110) appliquent la chromatographie en phase gazeuse à l'exploration des hyperplasies surrénales congénitales, séparant les dérivés du type pregnane sous forme d'esters triméthylsilyl. Ils constatent une fois de plus l'accroissement du pregnanetriol et à un moindre degré de la pregnanetriolone et du pregnanetetrol. Ils signalent en outre que chez le nourrisson, ce sont la pregnanetriolone et le pregnanetetrol qui sont prédominants, comme le montre l'évolution du rapport pregnanetrilone + pregnanetétrol/ pregnanetriol qui égale à 2,33 chez un cas de 16 mois, tombe à 0,19 chez l'adulte.

HALPERIN et FINKELSTEIN en 1967 (85) précisent que ces deux métabolites ne sont rencontrés qu'en cas d'hyperplasie surrénale et qu'on n'en a jamais retrouvé chez des sujets sains.

En 1969, MAKIN (124) propose d'améliorer le calcul de l'index de 11 Oxygénation en utilisant la chromatographie en phase gazeuse.

La même année JANOSKY et KELLY (103) signalent la présence de stéroides 16α hydroxylés en quantités inhabituellement élevées chez des nouveaux-nés et en particulier dans le cadre des hyperplasies surrénales congénitales avec perte de sel. Ils discutent le rôle natriurétique et anti-aldostérone éventuel de la 16α hydroxyprogestérone.

Ce n'est qu'en 1971 que la revue STEROIDS (170) publie pour la première fois une revue complète des stéroides obtenus chez un nouveau-né normal par chromatographie gaz-liquide. Le Stéroidogramme différe alors notablement de celui de l'adulte du fait de la prédominance des stéroides 3β Hydroxylés avec double liaison en 5 et bien souvent 16α Hydroxylés.

GUSTAFSSON et OLIN (82) publient pour la première fois en 1972 l'étude du stéroidogramme de deux nouveaux-nés porteurs d'hyperplasie surrénale congénitale : ils insistent d'une part sur les différences déjà signalées du fait du

métabolisme si particulier à cet âge et d'autre part l'importance de l'excrétion du glycuronides stéroidiens saturés lors de la maladie, à la différence du sujet normal.

HAMILTON et GRAY (86) en 1972 constatent sur 6 cas que dans le cadre des hyperplasies surrénales congénitales, les formes sans perte de sel se distinguent des pertes de sel par une excrétion plus importante du pregnandiol et du pregnanetriol ce qui serait en faveur d'une différence résidant dans la synthèse de la progestérone.

Enfin DESGRES J., BEGUE R.J. et PADIEU P. ont déjà publié en 1973 (47) l'application à l'analyse stéroidienne du procédé qui a été employé pour l'étude réalisée dans cette thèse avec les résultats de son application à l'étude de nouveaux-nés présentant une hyperplasie surrénale congénitale (48).

Au terme de cette rapide revue où n'ont pu être retenues que les communications apportant des éléments originaux à l'étude des excrétions urinaires dans le cadre des hyperplasies surrénales congénitales, quels sont les points de convergence de la littérature:

Tous les auteurs s'accordent sur l'augmentation importante des 17 Oxostéroides. Il s'agit là malheureusement d'un signe peu spécifique.

De plus d'intérêt est la constatation d'une augmentation proportionnellement plus marquée des 11 Oxy 17 Oxostéroides, que presque tous les auteurs ont constaté que ce soit sous forme de la fraction C de JAYLE, de vagues VI et VII de la technique de DINGEMANSE, ou sous forme de 11 hydroxy ou 11 oxo androstérone ou étiocholanolone.

On a pu ainsi définir avec HILL (90) sans considération d'âge et de sexe un index de 11 Oxygénation, ou rapport des stéroides 11 Oxy 17 Oxo aux stéroides 11 Désoxy ; 17 Oxo qui passe de 0,24 chez le sujet normal à 2,3 dans l'hyperplasie surrénale congénitale. Un article de MAKIN en 1971 fait la nomenclature des causes d'erreur possibles (125).

Toutefois BERGSTRAND, BIRKE et PLANTIN signalent que la proportion des 11 Déoxy 17 Oxostéroides s'accroît avec l'âge du porteur de l'hyperplasie surrénale (9).

Parmi les 17 Oxostéroïdes, la plupart des auteurs s'accordent à dire que l'accroissement porte surtout sur l'androstérone et à un moindre degré sur l'étiocholanolone, mais presque pas sur la Déhydroépiandrostérone qui est normale ou basse en pourcentage.

Parmi les 11 Oxy 17 Oxostéroïdes, le métabolite prédominant semble être la 11 β Hydroxyandrostérone qui apparait très augmentée (104), (128), à un moindre degré la 11 céto-étiocholanolone; La présence de 11 β Hydroxy-étiocholanolone est discutée : MASUDA (128) ne la retrouve pas, BONGIOVANNI (13) en retrouve une faible quantité.

Enfin l'ensemble des auteurs s'accordent - au moins chez l'enfant- à trouver une nette prédominance des dérivés 5 α de la série androstane sur les dérivés 5 β de la série étiocholane dans les 17 Oxostéroïdes (104), (11), (71). Toutefois dans un cas de révélation tardive post-pubertaire décrit par JAYLE en 1958 on constatait l'inverse (105).

Pour les 20 hydroxy 21 déoxystéroïdes, l'unanimité se fait sur la présence en quantités importantes de pregnanetriol 3α 17α 20α : cette augmentation s'accentuerait avec l'âge, et serait moins marquée avant l'âge d'un an. Mais ce métabolite n'est pas le seul rencontré, et l'on note la présence à des taux bas :

Pregnandiol ou (5β-pregnane-3α, 20α-diol)

17 Hydroxypregnanolone ou (3α,17α-dihydroxy-5β-pregnane 20-one)

11 cétopregnandiol ou (3α,20α-dihydroxy-5β-pregnane-11-one)

Pregnanetriolone ou (3α, 17α, 20α tri-hydroxy-5β-pregnane-11-one)

Pregnanetetrol (5β pregnane - 3α,11β, 17α,20α-tetrol)

Enfin depuis que l'on s'intéresse à la stéroïdogénèse du nourrisson, les auteurs se sont aperçus que du fait de la faible activité de la 3β Hydroxystéroïde Oxydo-réductase dans la période néo-natale on découvrait chez des enfants normaux de très nombreux stéroïdes de la forme 3β hydroxy double liaison Δ en C5, hydroxylés en C 11 du fait du métabolisme périphérique (156). Naturellement on retrouve les mêmes particularités métaboliques dans le cadre des hyper-

plasies surrénales congénitales du nourrisson (170) avec apparition de métabolites " Δ 5 Pregnéne 3β hydroxy" dans la fraction sulfate : la 3β, 21 dihydroxy-Δ5-pregnéne -20-one et le Δ5-pregnene-3β, 20α, 21-triol curieusement hydroxylés en 21 à coté de composés saturés excrétés dans la fraction glycuronide qui est extrèmement importante chez le nourrisson atteint d'hyperplasie surrénale congénitale, en particulier le pregnanetriol et la 3α, 16α -Dihydroxy-pregnane-20-one.

Si l'on admet que ces différences avec les éliminations de l'adulte et de l'enfant sont liées à l'immaturité de la surrénale et à l'activité temporaire de la zone foetale, elles doivent disparaitre rapidement en quelques mois. Mais si la littérature semble confirmer cette disparition, elle relève également des différences entre les hyperplasies surrénales révélées dans l'enfance, mais après un an et celles de révélation tardive qui ne seront découvertes qu'à la puberté ou au-delà.

En effet, l'on constate que chez l'enfant :

- les 11 Oxy 17 Oxostéroides sont beaucoup plus élevées que chez l'adolescent, en particulier grace à un accroissement majeur de la 11 β hydroxy-androstérone.

- la prédominance des métabolites 5α est plus marquée que chez l'adolescent (80), (105), (11).

- Enfin, si l'on établit le rapport des 11 Hydroxy 17 Oxostéroides au 11 Céto 17 Oxostéroides on le trouve d'autant plus élevé que la révélation de l'hyperplasie surrénale a été plus précoce (mais après la période néo-natale) (13).

- Par contre le taux de pregnanetriol serait moins élevé chez l'enfant atteint que chez l'adolescent (11), (126).

Quand on compare avec les données de la littérature les résultats obtenus dans nos 8 cas que l'on peut répartir schématiquement en trois groupes :

4 cas étudiés en période néo-natale : le nº 1 BUT., le nº 2 BOU., le nº 3 NAR., le nº 4 DEM.

1 forme de révélation semi-précoce certaine, le cas nº 5 MAT., et peut-être également le cas nº 6 ROB.

2 formes de révélation tardive : cas nº 7 et 8, GUY. et FE.

L'on constate :

- un accord complet en ce qui concerne l'augmentation globale des 17 Oxostéroides
- en ce qui concerne leur répartition :

° La prédominance des dérivés 5 α est en accord avec les données de la littérature ; le rapport des dérivés androstane/étiocholane est toujours supérieur à 1, et ceci dans n'importe lequel des trois groupes et en particulier dans les deux cas de révélation tardive (rapports respectivement à 2,1 et 1,8) ce qui est en désaccord avec la référence (105).

° L'index de 11 Oxygénation, ou rapport des dérivés 11 Oxy 17 Oxo aux dérivés 11 Désoxy 17 Oxo ont constamment élevé et ceci d'autant plus que la révélation a été plus précoce, sauf chez le nouveau-né où cet index est très faible à 0,25 (aux environs de 1 chez l'enfant et l'adolescent) ce qui est en désaccord avec les données de la littérature.

° L'importance de l'augmentation de la 11 β Hydroxyandrostérone qui atteint 7,35 mg en moyenne sur les 4 cas révélés après 1 an, représentant dans 2 cas plus de la moitié des 17 Oxostéroides, un peu moins élevé chez le nouveau-né.

° Le rapport parmi les 11 Oxy 17 Oxostéroides des dérivés 11 Hydroxy aux dérivés 11 Oxo est plus élevé chez les hyperplasies de révélation précoce en accord avec la littérature, mais là encore pas chez le nourrisson.

° L'importance des dérivés 16 Hydroxylés de la Déhydroépiandrostérone chez le nouveau-né ; ils représentent plus du double des autres 17 Oxostéroides dans tous les cas ; ils expliquent le faible niveau atteint par l'index de 11 Oxygénation.

- Pour les 20 hydroxy 21 déoxystéroides :

Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature à propos de l'augmentation du pregnanetriol 20 α ; mais si les taux du pregnanetriol des hyperplasies de révélation précoce pré-pubertaire de l'adolescent sont plus élevés que chez les hyperplasies de révélation tardive post-pubertaire comme dans les références que nous avons lues, il est par contre nettement plus bas dans les formes néo-natales (moyenne 1,23 mg).

Ceci est évidemment dû à la faiblesse de l'excrétion globale des stéroides à cet âge.

Il faut surtout signaler l'importance pratique d'autres dérivés de la même série qui ont sur le pregnanetriol l'avantage de n'être normalement présents qu'à l'état de traces : la 17α hydroxy-pregnanolone, la pregnanetriolone ; ils sont élevés en cas d'hyperplasie tant dans nos cas que dans la littérature.

Enfin trois produits non saturés paraissent assez particuliers aux nourrissons :

- ceux de la série androstène (androstènetriol 16α et 16 Oxoandrostènetriol)
- ceux de la série pregnenolone : 16α-hydroxy-pregnenolone.

Ces métabolites sont tous très augmentés en cas d'hyperplasie surrénale congénitale, surtout la 16α-hydroxy-pregnenolone qui voit son taux urinaire multiplié par 3 à 7.

Au terme de cette comparaison avec les résultats de la littérature, on relève dans l'ensemble une assez bonne concordance. Il faut toutefois insister sur le caractère particulier du métabolisme stéroidien du nouveau-né, qui avait d'ailleurs déjà été signalé, à l'origine d'un profil stéroidien spécifique.

Enfin, il n'est sans doute pas inutile de signaler que des études par chromatographie en phase gazeuse ont pu être réalisés chez plusieurs de nos malades, alors qu'ils étaient en cours de traitement par le Dectancyl : dans tous les cas où le freinage réalisé a été suffisant, le profil chromatographique rentre dans les limites de la normale.

C O N C L U S I O N S

Grâce à un nouveau procédé de chromatographie en phase gazeuse mis au point dans le laboratoire d'exploration fonctionnelle en chimie biologique et dans celui de biochimie médicale, il a été procédé à l'étude des éliminations stéroidiennes urinaires, et plus précisément des 17 Oxostéroides et des 20 Oxo 21 Déoxy C 21 stéroides, chez huit malades atteints d'hyperplasie surrénale congénitale par déficit en 21 hydroxylase, présentant des tableaux cliniques et des âges de révélation différents. Quatre cas concernaient des nouveaux-nés et s'accompagnaient de perte de sel, deux cas se révélaient chez l'enfant avec la puberté, deux autres enfin se manifestaient après la puberté, l'un chez une adolescente à l'occasion de troubles des régles, l'autre chez une femme adulte par une stérilité secondaire.

Malgré les nombreuses difficultés soulevées par la mise au point du procédé (extraction quantitative des stéroides à partir des urines, hydrolyse compléte des conjugués stéroidiens, formation de dérivés stables dans les conditions de séparation, mise au point de normes de travail permettant une réponse quantitative) celui-ci s'avére fiable, relativement rapide (3 jours) et d'un rendement satisfaisant malgré sa relative simplicité.

Les valeurs obtenues pour chacun des stéroides dans nos huit cas corroborent dans l'ensemble les résultats relevés dans la littérature ; elles mettent en lumière les particularités déjà connues du métabolisme stéroidien du nouveau-né qu'il soit ou non porteur d'hyperplasie surrénale congénitale.

Le Président de la Thèse,

R. PUTELAT

VU et permis d'imprimer
Dijon, le 4 Février 1974
Le Doyen,
J.B. BOUHEY

B I B L I O G R A P H I E

- - - - - - - - - - - - - - -

1 - ACHESON
Journal of Anatomy 1954, 88, p 498-508

2 - ADLERKREUTZ LUUKAINEN
Fractionation of 17 Ketosteroids
In SCHOLLER R, JAYLE M.F. "Chromatographie en phase gazeuse des stéroides hormonaux appliqués aux liquides biologiques" Paris, DUNOD, 1968, p 451

3 - AZNAR R.A., ZAMORA M.E., HERRERA J.E.
Deux cas de pseudo-hermaphrodisme par hyperplasie surrénale congénitale liée à un bloc en 21, étude par chromatographie en phase gazeuse des stéroides urinaires (espagnol)
Revista Clin. Espan. III nº 4, p 365-374, 1968

4 - BAILEY E.
The use of gas-liquid Chromatography in the assay of some corticosteroids in urine
Journal of Endocrinology 1964, 28, p 131-138

5 - BAILLIE,BROOKS,MIDDLEDITCH.
Comparison by gas-liquid Chromatography and Mass Spectrometry of Corticosteroids derivatives
Advance in Chromatography Symposium Las Vegas 1971

6 - BARTTER F.C., SIMOPOULOS A.P., MARSHALL J.R., DELEA C.J.
Studies of the deficiency of 21 hydroxylation in patients with congenital adrenal hyperplasia
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1971, 32, nº 3, p 438

7 - BEALE,CROFT,TAYLOR.
Quantitative cleavage of glucuronides and rate of hydrolysis of conjugated urinary steroids catalysed by liver mammalian β Glucuronidase
Steroids 1969, 13, nº 4, p 429

8 - BEALE,CROFT,TAYLOR
Quantitative Analysis by Gas-Phase Chromatography of steroids in health and illness
Steroids 1971, 18, nº 5, p 621

9 - BERGSTRAND C.G., BIRKE G., PLANTIN L.O.
Differences in Corticosteroid excretion pattern between infants and children with the Adrenogenital Syndrome
Acta Endocrinologica (Kbh) 1960, 34, p 508-512

10 - BERRET, NEIL
Interest of Gas-liquid Chromatography in the estimation and fractionation of 17 Ketosteroids
Clinical Chemistery 1966, 12, p 399

11 - BERTRAND J., CAUTENET B., OLLAGON C., ROUX H., LORAS B., FOREST M., DE PERETTI E.
Etude par chromatographie sur papier des 17 Cétostéroides urinaires dans 15 cas d'hyperplasie surrénale congénitale
Annales d'Endocrinologie 1965, 26, p 824-832

12 - BIGLIERI E.G., HERRON M.A., BRUST N.
17 Hydroxylation deficiency in man
Journal of Clinical Investigation 1966, 45, n° 2, p 1946

13 - BONGIOVANNI A.M., EBERLEIN W.R., SMITH J.D., MAC PADDEN A.J.
The urinary secretion of three C 21 Methyl Corticosteroids in the adrenogenital syndrome
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1959, 19, p 1608

14 - BONGIOVANNI A.M.
The Adrenogenital syndrome due to 3 β Hydroxysteroid dehydrogenase deficiency
Journal of Clinical Investigation 1962, 41, p 2086

15 - BONGIOVANNI A., ROOT AL.
Adrenogenital Syndrome
New England Journal of Medicine 1963, 268, n° 24, p 1342

16 - BONGIOVANNI A.M. et AE
Disorders of Adrenal steroids Biogenesis
Recent Progress in Hormonal Research 1967, 23, p 375-449

17 - BONGIOVANNI A., EBERLEIN W.R., MOSHANG T. Jr
Urinary excretion of Pregnanetriol and Δ 5 Pregnenetriol in two forms of Congenital Adrenal Hyperplasia
Journal of Clinical Investigation 1971, 50, p 2751-2754

18 - BRICAIRE H., LEPRAT J., LUTON J.P.
Aspects cliniques des troubles enzymatiques congénitaux de la Cortico-Surrénale
Dans 8° Réunion des Endocrinologistes de langue française "Troubles Congénitaux de l'Hormonosynthèse " p 176-198
Paris, DOIN-MASSON 1965

19 - BRICAIRE H., LUTON J.P., LAUDAT P., LEGRAND J.C., TURPIN G., CORVOL P., LEMMER M.
A new male Pseudohermaphroditism associated with Hypertension due to a block of 17α Hydroxylation
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1972, 35, n° 1, p 67-72

20 - BROOKS C.W.J.
Studies of Acetylated Corticosteroids and related 20 Oxopregnane derivatives by Gas-liquid Chromatography
Analytical Chemistery 1965, 37, p 636

21 - BROOKS C.W.J.
Fractionation of Urinary Steroids before Gas-liquid Chromatography
Memoirs of the Society for Endocrinology 1966, p 143

22 - BROOKS C.W.J.
Complementary use of thin-layer chromatography, gas-phase chromatography and mass-spectrometry for steroid analysis
In SCHOLLER R., JAYLE M.F. "Chromatographie en phase gazeuse des stéroides hormonaux appliquée aux liquides biologiques"
Paris DUNOD, 1968, p 75

23 - BURCHFIELD STORRS
"Biochemical Applications of Gas Chromatography"
Livre publié en 1962 par Academic Press, New-York London

24 - BURSTEIN S., LIEBERMAN S.
Hydrolysis of Ketosteroids hydrogen Sulfates by Solvolysis procedures.
Journal of Biological Chemistery 1958, 233, n° 2, p 331-335

25 - CAMACHO A.M., MIGEON C.J.
Studies on the origin of Testosterone in the urine of normal adults subjects and patients with various endocrine disorders
Journal of Clinical Investigation 1964, 43, n°6, p 1083-1089

26 - CAMACHO A., MIGEON C.J.
Excretion and secretion rate of Testosterone by normal adults and subjects with Congenital Adrenal Hyperplasia
Journal of Clinical Endocrinology 1966, 26, n° 8, p 893-896

27 - CASTEL, ROCHE, DARIDON, BAUDET
Hyperplasies Surrénales Congénitales
Ouest Médical 1969, 22, n° 10, p 861-872

28 - CAWLEY et Al
Hydrolytic products of 17 Ketosteroids : A Gas-chromatographic Evaluation
Clinical Chemistery 1965, 11, n° 11, p 1009

29 - CHAMBAZ, HORNING E.C.
Trimethylsilyl ethers of Steroids
Analytical Letters 1967, I (3), p 201-211

30 - CHAMBAZ E.M., HORNING E.C.
Conversion of Steroids in Trimethylsilyl derivatives for Gas-phase analysis
Analytical Biochemistery 1969, 30, p 7-24

31 - CHAMBERLAIN J., KNIGHTS B.A., THOMAS G.H.
Steroid Metabolites Analysis by Gas-Chromatography
Journal of Endocrinology 1963, 26, p 367-387

32 - CHATTORAJ, SCAMONEGA
A Gas-Chromatographic technique for instant measure of urinary pregnanediol and pregnanetriol after ammonium sulfate precipitation
Steroids 1967, 9, n° 3, p 327

33 - CHATTORAJ, OKERHOLM, PINKUS, CHARLES, WOTIZ
Quantitative extraction of conjugated steroids in human urine
Steroids 1970, 16, n° 1, p 68

34 - CLAYTON B.
Diagnosis and behaviour in front of Adrenal Congenital Hyperplasia
Proceedings of the Royal Medical Society 1970, Octobre

35 - CLEVELAND, MIGEON C.J., NIKEZIC
Response to Su 4885 of males with congenital adrenal hyperplasia and their parents
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1962

36 - CONTI
Irsutismo e fisiopatologia steroidea
Folia Endocrinologica, 21, n° 5, p 529

37 - COOPER,CREECH
The application of Gas-liquid Chromatography to the analysis of urinary 17 Ketosteroids
Analytical Biochemistery 1961, 2, p 502-511

38 - CRAMERS C.R., RIJKS J.A., BOCEK P.
Packed versus capillary columns in gas chromatography
Clinica Chimica Acta N° Special, 34, p 159, 1971
"Gas Chromatography of Steroids"

39 - CREECH
Separation and measure of 17 Ketosteroids, pregnandiol, pregnanetriol on a single column
Journal of Gas Chromatography 1964, n° 2, p 195

40 - CURTIUS H.C., MULLER M.
Gas-liquid Chromatography of 17 Ketosteroids and Progesterone metabolites of urine : Comparison of differents methods of hydrolysis
Journal of Chromatography 1967, 30, p 410-427

41 - DECOURT J., JAYLE M.F., BAULIEU E.
Virilisme tardif avec excrétion accrue de pregnanetriol et insuffisance de production de Cortisol
Annales d'Endocrinologie, Paris 1957, 18, n°3, p 416

42 - DECOURT J., GUINET P.
Dosage des stéroides urinaires - Hyperplasie Surrénale Congénitale
Dans "Les états intersexuels" livre publié en 1962 chez MALOINE S.A.

43 - DEGENHART, VISSER, WILMUK, FRANKENA
Production and excretion of Testosterone in children with Congenital Adrenal Hyperplasia
Acta Endocrinologica (Kbh) Suppl. 100, p 51 (1965)

44 - DEGENHART, VISSER
Aldosterone and Cortisol secretion rate in newborns and infants with congenital Adrenal Hyperplasia, suggesting differences of 21 Hydroxylation defect between salt-losers and non salt-losers
Acta Endocrinologica (Kbh) 1965, 48, p 587-601

45 - DEHENNIN L.A. et SCHOLLER R.
Corrélations entre le temps de rétention en Chromatographie Gaz-liquide et la structure moléculaire des stéroides C 18
Ve Symposium de Chromatographie, Septembre 1968, Bruxelles, p 370

46 - DE PAOLI J.C., NISHIZAWA E., EIKNES K.B.
Hydrolysis of conjugated 17 Ketosteroids
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1963, 23, p 81

47 - DESGRES J., BEGUE R.J., PADIEU P.
Analyse qualitative et quantitative des 17 Oxostéroides et des 20 Hydroxy 21 Désoxystéroides urinaires par chromatographie Gaz-liquide et par Spectrométrie de masse
Clinica Chimica Acta 1973, 46, p 277-296

48 - DESGRES J., BEGUE R.J., CURIE C., NIVELON S.L., PADIEU P.
Identification and quantitative assay of steroids in Congenital Cortico-adrenal Hyperplasia in newborns infants by Gas-liquid Chromatography and Gas-Chromatography-Mass-Spectrometry
International Symposium on Mass Spectrometry in Biochemistery and Medecine, Milan, 7-8 mai 1973
Raven Press, New-York, Sous-presse

49 - DESHPANDE, JENSEN, BULBROOK, DOONS
In vivo Steroidogenesis by human adrenal
Steroids 1967, 9, nº 4, p 393

50 - DRAY F., WELIKY D.
Thin Layer and Gas-chromatographic separation and Mass-spectrometry identification of steroids O-Methyl Oximes
In SCHOLLER R., JAYLE M.F. "Chromatographie en phase gazeuse des stéroides hormonaux appliqués aux liquides biologiques"
Paris DUNOD, 1968, p 105

51 - DREKTER I.J., HEISLER A., SCISM G.R., STERN S., PEARSON S., MAC GAVACK T.H.
The determination of Urinary Steroids I) The preparation of pigment-free extracts and a simplified procedure for the estimation of total 17 Ketosteroids
Journal of Clinical Endocrinology 1952, 12, p 55-65

52 - DUCHARME, LEBOEUF, SANDER
Steroid metabolites and C 21 conjugates in prematurity
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1970, 30, p 96

53 - DUVIVIER J.
Thin-layer Chromatography of some Aetiocholenics Acids derived from Cortico-stéroid Oxydation
Journal of Chromatography 1965, 19, p 352-357

54 - EBERLEIN W.R., BONGIOWANNI A.
Partial characterization of urinary adrenal steroids in Congenital Adrenal Hyperlasia
Journal of Clinical Investigation, 1955, 34, nº 2, p 1337

55 - EBERLEIN W.R., BONGIOVANNI A., SMITH, PODDEN
Urinary excretion of three methyl C 21 Corticosteroids in Adrenogenital syndrome
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1959, 19, p 1608

56 - EBERLEIN W.R.
Steroids and Steroic in umbilical cord blood
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1965, 25, p 1101-1117

57 - EDWARDS R.W.H., MAKIN H.L.J., BARRATT T.M.
The steroid 11 Oxygenation Index : a rapid method for use in the diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia
Journal of Endocrinology, 1964, 30, p 181-194

58 - EIKNES K.B.
Estimation of submicrogram concentrations in biological aliquots
In SCHOLLER R., JAYLE M.F. "Chromatographie en phase gazeuse des stéroides hormonaux appliquée aux liquides biologiques"
Paris, DUNOD, 1968, p 238

59 - ENEROTH P., FERNGREN H., GUSTAFSSON J.A., IVEMARK B., STERNBERG A.
Excretion of steroid hormones in an anencephalic newborn infant
Acta Endocrinologica (Kbh), 1972, 70, p 113-121

60 - ENYE, NEVILLE, ORR, ROYAT
A quantitative method of Gas-chromatography for Triméthylsilyl ethers and Methoximes of steroids
Steroids 1970, 16, N° 4, p 377

61 - ERNOULD H.J., BURET J., DEMEY-PONSART Mme
Etude de l'élimination stéroidienne urinaire au décours d'un cas d'hyperplasie surrénale congénitale par déficit en 21 et 11 β Hydroxylase
Annales d'Endocrinologie Paris, 1962, 23, p 569-576

62 - FALES H.M., LUUKAINEN T.
O Methyloximes as carbonyl derivatives in gas-chromatography, mass-spectrometry and nuclear magnetic resonance
Analytical Chemistery 1965, 37, nº 7, p 955

63 - FRANCE J.T., RIVERA, MAC NIVEN N.L., DORFMAN R.I.
Determination of androsterone , etiocholanolone and dehydroepiandrosterone by Gas-liquid Chromatography
Acta Endocrinologica (Kbh) 1964, Supplementum 90, p 71-80

64 - FRANCE J.T., RIVERA R., MAC NIVEN N.L., DORFMAN R.I.
Determination of androsterone, etiocholanolone and dehydroepiandrosterone in the urine by Gas Chromatography
Steroids 1965, 5, p 687

65 - FRANKS R.C.
Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1972, 35, p 831-835

66 - FUKUSHIMA D.K., GALLAGHER T.F.
Steroid isolation studies in Congenital Adrenal Hyperlasia
Journal of Biological Chemistery 1957, nº 229, p 85

67 - GALLAL O.M., RUDD B.T., DRAYER N.M.
Evaluation of the 21 hydroxylase defect in Congenital Adrenal Hyperplasia
Arch. Dis. Childhood 1968, 43, nº 2, p 410

68 - GALLAL O.M., DRZYER N.M., RUDD B.T.
Urinary testosterone in children with congenital adrenal hyperplasia
Acta Paediatrica Scandinavia 1970, 59, p 137-140

69 - GARDINER W.L., HORNING E.C.
Gas-liquid Chromatographic separation of C 19 and C 21 human urinary steroids by a new procedure
Biochimica Biophysica Acta 1966, 115, p 524-526

70 - GARDINER W.L., BROOKS C.J.W., HORNING E.C.
Urinary steroid pattern of the human newborn infant
Biochimica Biophysica Acta 1966, 130, p 278-281

71 - GARMENDIA, NICOLIS, GABRILOVE
Determination of prenanetriol and neutral 17 Ketosteroids by Gas-liquid Chromatography
Steroids 1971, 18, n° 2, p 113

72 - GAUDY, PETERSON
Measure of plasmatic Testosterone and 17 Ketosteroids by double isotopic dilution method
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1968, 28, p 949

73 - GIRARD F., BINOUX M., CANLORBE P., MOZZICONACCI P.
Etude de l'activité corticotrope du plasma dans l'hyperplasie surrénale congénitale
Annales d'Endocrinologie Paris 1965, 25, p 749-798

74 - GOLDMAN A.S., WINTER J.S.D.
Activities of various steroidogenic enzymes in two forms of experimental Adrenal Hyperplasia
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1967, 27, n° 2, p 1717

75 - GOLDMAN A.S.
Experimental Congenital Adrenocortical Hyperplasia : Persistent post natal deficiency in activity of 3 Hydroxysteroid deshydrogenase produced in utero
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1967, 27, n° 2, p 1041

76 - GOLDZIEHER, BEERING
Metabolism of 11 β Hydroxyandrostenedione, adrenosterone and hydrocortisone in urinary 11 Oxy 17 Oxosteroids
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1969, 29, p 171-178

77 - GOLDZIEHER, AXELROD
In vivo conversion of marked progesterone (C 14 on C4) in androsterone and etiocholanolone
Steroids 1971, 17, p 209

78 - GREEN, HALLAWAYS, BLACKER
An ameliorated method for the estimation of tetrahydrocortisol and tetrahydrocortisone in urine
Clinica Chimica Acta 1968, 20, nº 2, p 189

79 - GROB K., GROB L.
Splitless injection on a Capillary column in Gas-Chromatography
Journal of Chromatographic Science 1969, Vol 7, p 584

80 - GUENEL J., BUREAU L., ORIEUX J.
Deficit en 21 Hydroxylase dépisté tardivement chez l'homme à l'occasion d'une asthénie chronique
Annales d'Endocrinologie Paris 1967, 28, nº 1, p 71-77

81 - GUINET P., BETHOUX R., NOEL G., PUTELAT R., REVOL A.
Deux cas de pseudo-hermaphrodisme féminin par hyperplasie surrénale congénitale. Modifications du fractionnement chromatographique des 17 Cétostéroides sous l'action de la Delta-Cortisone
Pediatrie 1957, 45, p 923-928

82 - GUSTAFSSON J.A., GUSTAFSSON S., OLIN P.
Urinary steroid excretion of two newborns with congenital adrenal hyperplasia by lack of 21 Hydroxylase
Acta Endocrinologica (Kbh) 71, p 353-364

83 - HALL K., HOKFELT B.
Clinical and Metabolical study of four siblings with congenital virilizing adrenal hyperplasia
Acta Endocrinologica (Kbh) 1966, 52, p 535-549

84 - HALL K., SMITH, HARKNESS, SMART
Parent's study of children with Congenital Adrenal Hyperplasia : Detection of heterozygotes
Proceedings Royal Society of Medicine 1970, 63, p 1040

85 - HALPERIN G., FINKELSTEIN M.
Biosynthesis of pregnanetriolone and pregnanetetrol in Congenital Adrenal Hyperplasia
Acta Endocrinologica (Kbh) 1967, p 439-451

86 - HAMILTON W., GRAY L.E.
Pregnanediol and pregnanetetrol in 21 Hydroxylase defect with or without salt-loss
Clinical Endocrinology 1972, 1, p 265-273

87 - HAMILTON W.
Congenital Adrenal Hyperplasia
Clinics in Endocrinology and Metabolism Juillet 1972

88 - HARA
Direct analysis of Corticosteroids as Trimethylsilyl ethers of Methoximes by Gas-phase Chromatography
Chemical Pharmacological Bulletin 1966, 14, p 1311-1314

89 - HEYNS
Dosage of 11 Deoxy 17 Ketosteroids by Gas phase Chromatography
In SCHOLLER R. et JAYLE M.F. "Chromatographie en phase gazeuse des stéroides hormonaux appliquée aux liquides biologiques"
Paris DUNOD 1968, p 415

90 - HILL E.E.
Chromatography of the 17 Ketogenic steroids in diagnosis and control of Congenital Adrenal Hyperplasia
Acta Endocrinologica (Kbh) 1960, 33, p 230-250

91 - HORNING E.C., MADDOCK K., ANTHONY K.V., VAN DEN HEUVEL W.J.A.
Quantitatives aspects of gas chromatographics separations in biological studies
Analytical Chemistery 1963, 35, n° 4, p 526-532

92 - HORNING E.C., BROOKS C.W.J., JOHNSON, GARDINER
Separation identification and estimation of human hormonal steroids and their metabolites. Application to adrenal steroids.
Separation Science 1966, I, (5), p 575-573

93 - HORNING E.C., HORNING M.G., IKEKAWA, CHAMBAZ E.M., JAAKONMAKI P.I., BROOKS C.W.J.
Studies of analytical separation of human steroids and steroids glucuronides
Journal of Gas Chromatography 1967, 5, p 283-289

94 - HORNING E.C., MOSS, HORNING M.G.
Formation and Gas-Liquid chromatographic behaviour of methoximes steroid ketones derivatives
Analytical Biochemistery 1968, 22, p 284-294

95 - HORNING E.C., DEVAUX P.G., MOFFAT A.C., SAKAUCHI N, HORNING M.G.
Application of Gas-Liquid Chromatography in clinical chemistery
Clinica Chimica Acta 1971, N° Special 34, p 135

96 - HORNING M.G., HUNG A., HILL R.M., HORNING E.C.
Variations of urinary steroid profiles after birth
Clinica Chimica Acta 1971, N° Special 34, p 261-268

97 - HORNING E.C., MOFFAT A.C.
Studies on the conception of a biomedical Gas Chromatograph "Advance in Chromatography" Symposium Las Vegas Decembre 1971, p 119

98 - HORTON R., FRASIER S.D.
Androstenedione and its conversion to plasma Testosterone in Congenital Adrenal Hyperplasia
Journal of Clinical Investigation 1967, 46, N° 6, p 1003

99 - JACOBS
Hirsutism and adrenal androgenic hyperplasy
American Journal of Obstetrics and Gynecology 1968, 101, p 37

100 - JACOBSOHN G.M., LIEBERMAN S.
Studies on the chemical cleavage of 17 ketosteroids urinary glucuronosides
Journal of Biological Chemistery 1962, 237, N° 5, p 1469

101 - JANNE O., PERHEENTUPA J., VIKHO R.
Plasmatic and urinary conjugated steroids in a 21 Hydrolase defect in children
Acta Endocrinologica (Kbh) 1971, Supplementum 155, p 162

102 - JANOSKI A.W., KELLY W.G.
On the metabolism of 16α hydroxy C 21 steroids : Evidence for the presence of a glucuronide of 16α hydroxypregnenolone in human urine and its utility in estimating the production rates of 16α hydroxyprogesterone and 16α hydroxypregnenolone
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1969, 29, p 1291

103 - JANOSKI A.H., ROGINSKI M.S., CHRISTY N.P., KELLY W.G.
On the metabolism of 16α hydroxylated C 21 steroids : Evidence for high rates of production of 16α hydroxyprogesterone and 16α hydroxypregnenolone in the salt-losing form of Congenital Adrenal Hyperplasia
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1969, 29, p 1301-1309

104 - JAOUDE, BAULIEU E.E., JAYLE M.F.
Fractionation by paper Chromatography of neutral 17 ketosteroids in Congenital Adrenal Hyperplasia
Acta Endocrinologica (Kbh) 1957, 26, p 30-42

105 - JAYLE M.F., WEINMAN J.H., BAULIEU E.E., VALLIN Y.
Virilisme postpubertaire discret par défaillance de l'hydroxylation en C 21
Acta Endocrinologica (Kbh) 1958, 29, p 513-524

106 - KAMPEN E.S., PANKER A.
Steroid spectra pattern recognition and quantitative analysis
Clinica Chimica Acta 1971, N° Special 34, p 241-260

107 - KELLY
A new technique to form Corticosteroid siliconides
Journal of Chromatography 1969, 43, p 229-232

108 - KELLY
Gas chromatography of some new Silyl derivatives of cortisone, cortisol and related steroids
Steroids 1969, 13, p 507

109 - KENNY, MALVAUX, MIGEON C.J.
Production rate of cortisol in newborns, infants and children
Pediatrics 1963, 31, p 360

110 - KINOSHITA K., ISURUGI K., KUNOMOTO Y., TAKAYASU H.
Gas Chromatographic estimation of urinary pregnanetriol, pregnanetriolone and pregnanetetrol in congenital adrenal hyperplasia
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1966, 26, p 1219-1226

111 - KINOSHITA K., ISURUGI K., MATSUMOTO Y., TAKAYASU H.
Gas-liquid chromatographic estimation of pregnenetriol
Steroids 1968, 11, p 1

112 - KIRSCHNER, FALES
Analysis of 17 hydroxysteroids in gas chromatography as bismethylenedioxy derivatives
Analytical Chemistery 1962, 34, p 1548

113 - KIRSCHNER, LIPSETT
Gas-liquid chromatography in quantitative studies of urinary 11 deoxy 17-ketosteroids
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1963, 23, p 259

114 - KITTINGER
Quantitative gas chromatography of adrenal steroids
Steroids 1968, 11, N° 1, p 47

115 - KLOPPER A.I.
An evaluation of the contribution of gas liquid chromatography techniques for the estimation of progesterone and pregnanesteroides
Clinica Chimica Acta N° Special 1971, 34, p 215-221

116 - KUPPENS P.S.H., DE JOUG
Some simplifications in routine gas-phase chromatographic analysis of steroids
In SHCOLLER R., JAYLE M.F. "Chromatographie en phase gazeuse des stéroides hormonaux appliquée aux liquides biologiques"
Paris, DUNOD, 1968, p 517

117 - LANDAULT C.
Les colonnes capillaires
Journées d'étude de chromatographie en phase vapeur
Clermont-Ferrand, 1971

118 - LAMB, DIGMANN, SUNNER
Woman plasmatic androgens
Acta Endocrinologica (Kbh) 1964, 45, p 243-253

119 - LIPSETT M.B., RITER
Steroids in congenital adrenal hyperplasia with belated revelation and virilization
Acta Endocrinologica (Kbh) 1961, 38, p 481-489

120 - LIPSETT M.B., KORENMAN S.G.
Androgen metabolism
The Journal of the American Medical Association 1964, 190, N° 8, p 757

121 - LIPSKY S.R., LANDOWNE R.A.
Effects of varying the chemical composition of the stationnary phase on the separation of certains C 19, C 21 and C 27 steroids by gas chromatography
Analytical Chemistery 1961, 33, p 819

122 - LOLLER, KUMBALL,TRUSCOTT
Steroid destruction during thin-layer chromatography
Steroids 1966, 8, N° 6, p 865

123 - LUUKAINEN T., VAN DEN HEUVEL W.J.A., HAAHTI E.O.A., HORNING E.C.
Steroid trimethylsilyl ethers properties
Biochimica Biophysica Acta 1961, 52, p 599-601

124 - MAKIN H.L.J.
The gas-liquid chromatography of steroid formates. An application in Congenital Adrenal Hyperplasia
Journal of Endocrinology 1969, 47, p 55-64

125 - MAKIN H.L.J.
Congenital Adrenal Hyperplasia and others syndroms associated with an elevated urinary steroid 11 Oxygenation index
Journal of Endocrinology 1971, 50, p 251-265

126 - MALMEJAC A.
Contribution à l'étude des applications cliniques du fractionnement des 17 Cétostéroides
Thèse Médecine Paris 1965, N° 509

127 - MARVIN A., KIRSCHNER, LIPSETT M.B.
Gas-liquid Chromatography in the quantitative analysis of urinary 11 Deoxy 17 ketosteroids
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1963, 23, p 255-260

128 - MASUDA M.
Urinary ketosteroids excretion pattern in Congenital Adrenal Hyperplasia
Journal of Clinical Endocrinology 1957, 17, p 1181

129 - MATUOKA H., TUCHIDA Y., NAKAGAWA T.
20α hydroxy-pregnen-4en-3one in infant's urine within 24 hours after delivery
Steroids 1968, 12, N° 3, p 381

130 - MATTOX, HEYLES, SALASSA, DION
Steroid urinary excretion pattern and salt-loss in Congenital Adrenal Hyperplasia
Journal of Clinical Endocrinology 1964, 24, p 519

131 - MAUME B.F., LUYTEN J.A.
Evaluation of Gas Chromatographic-Mass spectrometric and Mass Fragmentographic performance in steroid analysis with glass capillary collumns
Journal of Chromatographic Science 1973, II, p 607-610

132 - MAUVAIS-JARVIS P., BAULIEU E.E.
Studies on Testosterone metabolism : IV) : Urinary 5α and β Androstanediols and Testosterone and Dehydroisoandrosterone in normal people and hirsute women
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1965, 25, p 1167-1178

133 - MEMINI E., NORIMBERSKI J.F.
A technique of systematic analysis of urinary steroids
Biochemical Journal 1965, 95, p 1-16

134 - MEMINI E.
Steroid systematic analysis in biological materials
Memoirs for the Society of Endocrinology 1966, p 69

135 - MEMINI E.
The indirect analysis of 17 oxosteroids glucosiduronates in human urine
Biochemical Journal 1966, 99, p 747

136 - MEMINI E.
Determination of adrenals stercids by gas-chromatography and its application to clinical research
Annals of Clinical Research 1970, 2, p 263-276

137 - METCALF M.
Urinary 17 oxosteroids acid hydrolysis and decomposition
Steroids 1971, 17, n° 1, p 85

138 - MIGEON C.J., BAULIEU E.E.
Hyperplasie congénitale des surrénales. Etude biologique
Dans 8° Réunion des Endocrinologistes de Langue Française "Troubles Congénitaux de l'Hormonosynthèse" p 153-174
Paris DOIN-MASSON 1965

139 - MIGEON C.J., CAMACHO
Testosterone excretion and production in normal adults and patients with Congenital Adrenal Hyperplasia
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1966, 26, p 893

140 - MUEHLBACHER, SMITH
Three hydrolytic methods for urinary 17 ketosteroids sulfates. A gas-liquid chromatographic and colorimetric analysis comparison
Clinical Chemistery 1970, 16, N° 3, p 158

141 - MURAKAMI T., KUNISHI H.
Clinical application of quantitative analysis of urinary hormonal steroids and theirs metabolites by temperature programmed gas-liquid chromatography
Annali Paediatrica Japanica 1971, 17, fasc 3 et 4, p 23

142 - NAIR P.P., SARLOS, SOLOMON and TURNER
Separation of 17 ketosteroids and Estrogens by gas chromatography
Analytical Biochemistery 1964, 7, p 96-102

143 - NEHER
Nachweis von 3∝,16∝-Dihydroxy-pregnan-20-one in urinproben verschiedener herkunft
Helvetica Chimica Acta 1952, p 144

144 - NEW M.I., SEAMAN M.P.
Secretions rates of cortisol and aldosterone precursors in various forms of Congenital Adrenal Hyperplasia
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1970, 30, p 361

145 - NICOLS J.
Antenatal diagnosis of adrenocortical hyperplasia
Lancet, 7 June 1969, p 1151

146 - NORIMBERSKI J.K.
Evaluation of gas-liquid chromatography and others techniques for the estimation of corticosteroids
Clinica Chimica Acta 1971, N° Special 34, p 187

147 - PATTI A.A., BONAMO P., FRANLEY T.F., STEIN A.A.
Preliminary studies on the application of gas phase chromatography to separation of steroids in biological fluids
Acta Endocrinologica (Kbh) Supplementum 77, p 42

148 - PINELLI A., NAIR P.P.
Gas-liquid chromatographic separation of steroids and theirs derivatives on a dual component column of high thermal stability
Journal of Chromatography 1969, 43, p 223-228

149 - PINELLI A., NAIR P.P.
Thin layer steroid separation. Localisation by colorants
Journal of Chromatography 1970, 47, p 513-518

150 - PINELLI A., FORMENTO M.L.
A precise and sensitive method for steroid analysis in small urines samples by thin layer chromatography and gas-liquid chromatography
Journal of Chromatography 1972, 68, p 67-75

151 - PINKUS G., PINKUS J.
Conjugated estrogens precipitation in pregnant women urines
Clinical Chemistery 1970, 16 N° 10

152 - PREVOT A.F.
Les colonnes et leur utilisation
Journées d'étude de la chromatographie en phase vapeur
Clermont-Ferrand 24-25 mars 1971

153 - PUTELAT R., CABANNE F., FERRY C., MICHIELS, DUSSERRE
Précocité sexuelle chez un cryptorchide porteur d'un hypospade pénien
Annales d'Endocrinologie Paris, 1965, 25, N° 6, p 809-816

154 - RAMON, AVRAMOV, MAC NIVEN
A method for prenandiol, pregnanetriol and pregnanetriolone measure by gas chromatography
Steroids 1965, 6, p 177

155 - RAPP J.P., DAHL L.K.
Mendelian inheritance of 18 and 11β steroid hydroxylase activity in the adrenals of rats genetically susceptible or resistant to hypertension
Endocrinology 1972, 90, N° 6, p 1435

156 - REYNOLDS J.W.
Excretion of two Δ5-3β hydroxy-16α hydroxysteroids by normal infants and children
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1965, 25, p 416-422

157 - REYO, VIKHO R.
Gas-Chromatographic study of solvolizable plasmatic steroids
Acta Endocrinologica (Kbh) 1966, Supplementum 109

158 - RIVAROLA, JAEZ, MIGEON
Androgen study in subjects with Congenital Adrenal Hyperplasia
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1967, 27, p 624

159 - RIVERA R., DORFMAN R., FORCHIELLI E.
A modified method for the analysis of urinary 17 ketosteroids, pregnanediol and pregnanetriol by gas-liquid chromatography in normal subjects and subjects with various endocrine disorders
Acta Endocrinologica (Kbh) 1967, 54, p 37-50

160 - ROS A.
Profil gaz chromatographique des stéroides neutres urinaires totaux de l'homme adulte. Valeur de 18 stéroides hormonaux (en italien)
Bolletino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale Janvier 1969

161 - ROSENBLOOM A.L.
Salt-losing congenital adrenal hyperplasia in the Alaskian Eskimo
Journal of Pediatrics Février 1970, p 326-327

162 - ROS A.
Method for dry sampling in Gas Chromatography
Journal of Gas Chromatography 1965, 3, p 252

163 - RUDD B.T., RAYNER P.H.W.
Plasmatics and urinaries androgens levels in patients with congenital adrenal hyperplasia
Proceedings Royal Society of Medicine 1970, 63, N° 10, p 1039-1040

164 - BUTTEN G.A.F.M., LUYTEN S.A.
Analysis of steroids by high resolution Gas-liquid Chromatography I : Preparation of apolar columns
Journal of Chromatography 1972, 74, p 177

165 - SAKAUCHI, HORNING
Formation of ether trimethylsilyl derivatives from compounds with hindered hydroxyle functions
Analytical Letters 1971, 4,(I), p 41-52

166 - SANTILI J., MARTIN M.M.
Virilizing Adrenal Hyperplasia presenting in a prepubertal female
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1972, 34, p 427

167 - SCHOLLER R., DENEHIN
Some practical problems in gas chromatographic quantitative analysis
Dans SCHOLLER R., JAYLE M.F. "Chromatographie en phase gaseuse des stéroides hormonaux appliquée aux liquides biologiques " p 21
Paris, DUNOD, 1968

168 - SEMPE M.
Comment utiliser les données staturo-pondérales de la croissance de l'enfant ?
Cahiers Médicaux Lyonnais 1966, 42, N° 26, p 1969-2001

169 - SHACKLETON C.H.L., KELLY R.W., ADHIKARY P.M., BROOKS C.W.J. HARKNESS R.A., SYKES P.J., MIDDLETON F.L.
The identification and measurement of a new steroid : 16 β Hydroxydéhydroepiandrosterone in infant urine
Steroids 1968, 12, N° 6, p 705

170 - SHACKLETON C.H.L., GUSTAFSSON J.A., SJOVALL S.
Steroids in newborns and infants. Identification of steroids in urine from newborn infants
Steroids 1971, 17, N° 2, p 265-280

171 - SJOVALL S., VIKHO
Measure of androsterone and dehydroepiandrosterone in human plasma by gas-liquid chromatography
Steroids 1965, 6, p 597

172 - SIMOPOULOS A.P., MARSHALL J.R., DELEA C.J., BARTTER F.C.
Studies on the deficiency of 21 hydroxylase in patients with Congenital Adrenal Hyperplasia
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1971, 32, p 438

173 - SOMMERVILLE, COLLINS
Attempts of standardization for the thin-layer and gas-liquid chromatographic determination of steroids
Dans SCHOLLER R., JAYLE M.F. "Chromatographie en phase gaseuse des stéroides hromonaux appliquée aux liquides biologiques" p 225
Paris, DUNOD, 1968

174 - SPARAGANA M., KEUTEMAN E.H., MASON W.B.
Quantitative determination of individual C 19 O 2 and C 19 O 3 17 ketosteroids by gas chromatography
Analytical Chemistery 1963, 35, N° 9, p 1231

175 - SPARAGANA M.
Measure of urinary THE, THF and AlloTHF by gas-liquid chromatography
Steroids 1965, 6, N° 5, p 583

176 - STROTT C.A., YOSHIMI T., BARDIN C.W., LIPSETT M.B.
Blood progesterone and 17 hydroxyprogesterone levels and production rates in a boy with virilizing congenital adrenal hyperplasia
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1968, 28, p 1085-1088

177 - STROTT C.A., YOSHIMI T., LIPSETT M.B.
Plasma progesterone and 17 hydroxyprogesterone in normal men and children with congenital adrenal hyperplasia
Journal of Clinical Investigation 1969, 48, p 930-938

178 - THOMAS B.J., BULBROCK R.D.
A rapid method for the estimation of total 11 deoxy 17 oxosteroids in urine
Journal of Chromatography 1964, 14, p 28-36

179 - TOWNSEND, JAMES
Semi-automatic procedure for the plasmatic steroids determination
Steroids 1968, II, p 497-511

180 - TYLER F.H., WEST C.D.
Laboratory evaluation of disorders of the adrenal cortex
The American Journal of Medicine 1972, 53, p 664-672

181 - VAGUE, BOYER, LATROBE, NICOLINO, LIEUTRAUD, FOUILLOUX
Hyperplasie surrénale congénitale par déficit en 21 hydroxylase : deux cas familiaux et un troisième étudié à l'âge adulte
Annales d'Endocrinologie Paris 1967, 28, N° 2, p 149-176

182 - VAN DEN BERG P.M.J., COX Th. P. H.
An all-glass solid sampling device for open tubular columns in gas-chromatography
Chromatographia 1972, 5, p 301

183 - VAN DEN HEUVEL W.J.A., CREECH, HORNING E.C.
Estimation of 17 ketosteroids as trimethylsilyl ethers on various columns
Analytical Biochemistery 1962, 4, p 191-197

184 - VAN DEN HEUVEL W.J.A., HORNING E.C.
A study of retention-time relationships in gas chromatography in terms of the structure of steroids
Biochimica Biophysica Acta 1962, 64, p 416-429

185 - VAN DEN HEUVEL W.J.A., HORNING E.C.
Gas-chromatographic characterization of steroids ketones as N-N dimethyl hydrazones
Biochimica Biophysica Acta 1963, 74, p 560-563

186 - VAN DEN HEUVEL W.J.A., HORNING E.C.
Conditions for steroid separation by gas-liquid chromatography
Memoirs of the Society for Endocrinology Cambridge, 1966, p 39

187 - VAN DEN HEUVEL W.J.A., PATTERSON, BRALY
Use of bis-trimethylsilylacetamide in the preparation of derivatives for gas-liquid chromatography of some adrenocortical steroids
Biochimica Biophysica Acta 1967, 14, p 691-694

188 - VAN DEN HEUVEL W.J.A.
Complete hydrolysis of steroids conjugates and quantitative extraction of free steroids from urine
Canadian Journal of Biochemistery 1967, 45, p 191

189 - VAN DEN HEUVEL W.J.A.
Gas-chromatographic separation technique of steroids
Dans SCHOLLER R., JAYLE M.F. "Chromatographie en phase gazeuse des stéroides hormonaux appliquée aux liquides biologiques" p 1
Paris, DUNOD, 1968

190 - VAN DER MOLEN H.J., GROEN
Quantitative determination of submicrogramm amounts of steroids in blood by electron capture and flame ionization
Memoirs of the Society for Endocrinology 1966, p 155

191 - VAN DER MOLEN H.J., DE JUNG F.H., COOKE B.A.
Some aspects of steroid analysis in clinical chemistery laboratory, with special reference to the role of gas-liquid chromatography
Clinica Chimica Acta 1971, N° Special 34, p 169-185

192 - VERGNIAUD J.M.
Gas phase Chromatography : The application of gas-flow variations and back-flushing
Journal of Chromatography 1965, 19, p 495-503

193 - VERMEULIEN A.
Evaluation of a gas liquid chromatographic technique for the estimation of androgens
Clinica Chimica Acta 1971, N° Special 34, p 223-240

194 - VIHKO A., JANNE, SJOVALL
Determination of solvolizable plasmatic steroids
Dans SCHOLLER R., JAYLE "Chromatographie en phase gazeuse des stéroides hromonaux appliquée aux liquides biologiques" p 383
Paris, DUNOD, 1968

195 - VISSER H.K.A.
Inborn biosynthesis errors of adrenal corticoids
Acta Endocrinologica (Kbh) 1965, Supplementum N° 100, p 25

196 - VISSER H.K.A.
Congenitals disorders of Adrenocortical function
Triangle 1966, 7, (6), p 220-223

197 - VISSER H.K.A.
Pathological aspects of children adrenal hyperfunction : Congenital Adrenal Hyperplasia
Archives Disease Childhood 1966, 41, p 113

198 - VISSER H.K.A.
Congenital Adrenal Hyperplasia
Proceedings of the Royal Society for Medicine 1970, 63, p 1037

199 - VOLLMIN J.A.
Gas-chromatographic separation of steroids on a glass capillary column
Chromatographia 1970, N° 3, p 233

200 - VÖLLMIN J.A.
Separation and identification of urinary steroids on glass-capillary columns with a combination of gas-phase chromatography and mass spectrometry
Chromatographia 1970, N° 3, p 238

201 - VÖLLMIN J.A.
High resolution gas chromatography of urinary steroids on glass capillary columns
Clinica Chimica Acta 1971, N° Spécial 34, p 207-214

202 - ZUMOFF B., BRADLOW H.L.
Quantitative extraction and separation of conjugated steroids metabolites from human urine
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1963, 23, p 799-804

- -

-